



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Dipartimento di Scienze Biomediche

Corso di laurea magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione

**Costruzione di ceppi ibridi del lievito *Saccharomyces cerevisiae* mediante tecniche di ingegneria genetica**

**Relatore**

Prof. Alessandro Bertoli

**Correlatore**

Prof. Raffaele Lopreiato

**Laureanda**

Melania Mancini

**Matricola**

2016565

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



## RIASSUNTO

*Saccharomyces cerevisiae* è ampiamente considerata la specie di lievito più adatta per la produzione dei prodotti fermentati ad uso alimentare, grazie alla sua capacità di convertire rapidamente gli zuccheri in etanolo e anidride carbonica. Il suo largo uso ha condotto ad un perfezionamento crescente delle condizioni di fermentazione, ricercato anche, soprattutto a partire dal secolo scorso, con l'impiego di tecniche di miglioramento genetico dei ceppi, quali l'ibridazione. La tecnica di ibridazione classica consiste nell'incrocio di ceppi aploidi di tipo sessuale (*mating type*) opposto, selezionati per specifici caratteri fenotipici di interesse, e rappresenta attualmente l'unica modalità consentita e adottata per ottenere ibridi non-OGM in ambito industriale. Tuttavia, la maggior parte dei ceppi industriali presenta il carattere dell'omotallismo, che determina notevoli difficoltà per effettuare gli incroci, dovute all'auto-diploidizzazione delle spore aploidi. Considerato che l'incrocio tra due ceppi di lievito non sempre garantisce di ottenere un ibrido che possiede le caratteristiche desiderate, i tempi ed i costi elevati di un processo di ibridazione tradizionale sono spesso considerati troppo onerosi per avviare un programma a così alto rischio di successo.

In questo lavoro di Tesi, ceppi omotallici di *S. cerevisiae* sono stati ingegnerizzati utilizzando il sistema CRISPR-Cas9, per operare una delezione mirata del gene responsabile dell'omotallismo (i.e., *HO*), allo scopo di ottenere ceppi eterotallici capaci di produrre spore stabilmente aploidi. In particolare, i ceppi parentali selezionati per la costruzione degli ibridi (SPLZ07 e mPIETRA05), utilizzati in ambito enologico, sono stati scelti per tentare di mitigare l'elevata produzione di acido acetico da parte del ceppo mPIETRA05. Ottenuti i ceppi aploidi, è stata valutata la loro conformità con i corrispondenti parentali, analizzandone le capacità fermentative, per poi utilizzarli e generare diversi ceppi ibridi. Da ultimo, sono state valutate le caratteristiche degli ibridi con prove di fermentazione in mosto d'uva: l'evidenza sperimentale ha mostrato che gli ibridi SPLZ07/mPIETRA05 generati in questa Tesi effettivamente producono livelli di acido acetico intermedie tra i parentali, con una riduzione del 25% rispetto a mPIETRA05, sono dotati di buone attitudini fermentative e dalla capacità di consumare tutti gli zuccheri presenti nel mosto.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la costruzione di ceppi ibridi mediante tecniche di ingegneria genetica è estremamente vantaggiosa in termini di tempo e risorse, richiedendo pochi mesi di attività sperimentale per stabilire l'eventuale successo dell'incrocio, rispetto ad (almeno 2) anni necessari con un'ibridazione tradizionale. Tuttavia, producendo lieviti OGM il cui uso industriale è soggetto a legislazione, questo studio oggi si configura come un sistema di valutazione rapido della fruttuosità

di un incrocio tra due ceppi selezionati di *S. cerevisiae*, capace di fornire preziose indicazioni operative all'Azienda partner del progetto.

## ABSTRACT

*Saccharomyces cerevisiae* is widely considered the most suitable yeast species for the production of fermented food products due to its ability to rapidly transform sugars into ethanol and carbon dioxide. Its wide use has led to a growing improvement of the fermentation conditions, also pursued, especially since the last century, with the use of techniques for the genetic improvement of the strains, such as hybridization. The classic hybridization technique consists in crossing haploid strains of opposite sexual type (*mating type*), selected for specific phenotypic characters of interest, and is currently the only method allowed and adopted to obtain non-GMO hybrids in the industrial field. However, most of the industrial strains show the character of homothallism, which causes considerable difficulties in crossbreeding, due to the self-diploidization of the haploid spores. Considering that crossing two yeast strains does not always guarantee the obtaining of a hybrid that possesses the desired characteristics, the time and high costs of the traditional hybridization process are often considered too expensive to start a program with such a high risk of success.

In this Thesis, homothallic strains of *S. cerevisiae* have been engineered using the CRISPR-Cas9 system to operate a targeted deletion of the gene responsible for homothallic character (i.e., HO), in order to obtain heterothallic strains capable of producing stably haploids spores. In particular, the parental strains selected for the construction of the hybrids (SPLZ07 and mPIETRA05), used in the oenological field, were chosen to try to mitigate the high production of acetic acid of the mPIETRA05 strain. Once the haploid strains were obtained, their conformity with the corresponding parents was evaluated, analyzing their fermentative capacity, to then use them for the construction of the hybrid strains. Eventually, the characteristics of the hybrids were evaluated with fermentation tests in grape must: the experimental evidence showed that the SPLZ07/mPIETRA05 hybrids generated produce intermediate levels of acetic acid between the parents, with a reduction by 25% compared to mPIETRA05, they have good fermentative attitudes and the ability to consume all the sugars present in the must.

The results have shown that the construction of hybrid strains using genetic engineering techniques is extremely advantageous in terms of time and resources, requiring a few months of experimental activity to establish the possible success of the crossing, compared to (at least 2) years required with

a traditional hybridization. However, by producing GMO yeasts whose industrial use is subject to legislation, this study today takes the form of a rapid evaluation system of the fruitfulness of a cross between two selected strains of *S. cerevisiae*, capable of providing valuable operational indications to the partner company of the project.

## **PAROLE CHIAVE**

*Saccharomyces cerevisiae*

Genome Editing

Hybrid strains

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>7</b>
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
1.2 METABOLISMO.....	10
1.2.1 FERMENTAZIONE ALCOLICA.....	10
1.2.2 IL MOSTO D'UVA, SUBSTRATO DI FERMENTAZIONE.....	11
1.2.3 ACIDO ACETICO.....	12
1.3 MIGLIORAMENTO GENETICO: IBRIDAZIONE.....	14
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>17</b>
3.1 MICRORGANISMI UTILIZZATI.....	17
3.2 TERRENI DI COLTURA E MOSTO UTILIZZATI.....	17
3.3 ANALISI GENETICHE E MOLECOLARI.....	19
3.3.1 PLASMIDI.....	19
3.3.2 PCR.....	20
3.3.3 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO.....	23
3.3.4 ESTRAZIONE DNA PLASMIDICO DA BATTERI (MINIPREP).....	23
3.3.5 TRASFORMAZIONE ALTA EFFICIENZA.....	24
3.3.7 ESTRAZIONE DNA GENOMICO DA LIEVITO.....	26
3.3.7 SPORULAZIONE LIEVITI.....	26
3.3.8 DISSEZIONE TETRADI.....	27
3.3.9 DETERMINAZIONE MATING TYPE.....	28
3.3.10 IBRIDAZIONE.....	28
3.4 SAGGI DI MICROFERMENTAZIONE.....	29
3.4.1 CONTA CELLULARE CON CAMERA DI BURKER.....	29
3.4.2 PROVE DI FERMENTAZIONE.....	29
3.4.3 DETERMINAZIONE TITOLO ALCOLIMETRICO.....	31
3.4.4 DETERMINAZIONE ACIDO ACETICO.....	31
3.4.5 DETERMINAZIONE ACETALDEIDE.....	33
3.4.6 DETERMINAZIONE ANIDRIDE SOLFOROSA.....	33
3.4.7 DETERMINAZIONE CONTENUTO DI ACIDI ORGANICI E ZUCCHERI.....	34
3.4.8 ANALISI PROFILO AROMATICO.....	34

<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>36</b>
4.1 MODIFICAZIONE GENETICA DEI LIEVITI: CONVERSIONE DEI CEPPI DA OMOTALLICI A ETEROTALLICI .....	37
4.2 SPORULAZIONE E ISOLAMENTO DEI CEPPI APLOIDI .....	39
4.3 DETERMINAZIONE MATING TYPE .....	39
4.4 PROVE DI FERMENTAZIONE APLOIDI .....	41
4.5 CREAZIONE IBRIDI.....	43
4.6 PROVE DI FERMENTAZIONE IBRIDI.....	43
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>51</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>52</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* è un microrganismo eucariotico unicellulare appartenente al regno dei funghi, in particolare al *phylum* Ascomycota, che deve tale nome alla capacità delle cellule diploidi di produrre con la meiosi quattro spore aploidi racchiuse in una caratteristica struttura chiamata “asco” (Madigan et al., 2016). Il genoma del lievito *S. cerevisiae* è stato il primo, tra gli eucarioti, ad essere sequenziato completamente e consiste di poco più di 12 milioni di nucleotidi (12.068 kilobasi), organizzati in 16 cromosomi lineari (Goffeau et al., 1996). Grazie alla sua facilità di gestione e manipolazione, *S. cerevisiae* è di vasto utilizzo nell’industria alimentare per la produzione di prodotti fermentati, nelle biotecnologie industriali applicate alla chimica e alla farmaceutica, e rappresenta anche uno degli organismi modello più utilizzati per la ricerca nelle scienze biologiche e mediche.

Essendo un organismo aplodiplonte, le cellule di *S. cerevisiae* si trovano in natura sia in stato aploide, di forma sferica e diametro di 4  $\mu\text{m}$ , sia diploide, di forma ellissoidale e diametro di 6  $\mu\text{m}$  (Sherman F., 2002). Lo stato diploide è il più diffuso tra i lieviti naturali, data la loro maggiore capacità di adattamento e resistenza agli stress ambientali rispetto ai lieviti aploidi. In entrambi i casi, le cellule si riproducono in modo vegetativo per gemmazione (Figura 1.1), con un tempo di replicazione di circa 90 minuti in condizioni ottimali di crescita. Se stressate, come in carenza di fonti di carbonio o azoto, le cellule diploidi vanno incontro a sporulazione originando, per meiosi, quattro spore aploidi di diverso tipo sessuale, due “*a*” e due “ *$\alpha$* ” (*mating type*). Quando le condizioni ambientali diventano favorevoli, l’asco si rompe permettendo alle spore di iniziare la germinazione, ed eventualmente incrociarsi con spore di *mating type* opposto, in un processo chiamato coniugazione, dove i nuclei aploidi si fondono, formando una cellula diploide.

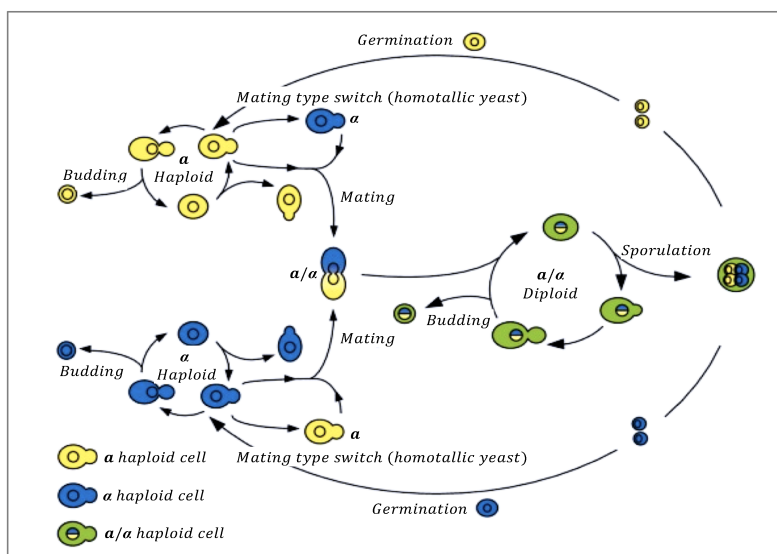
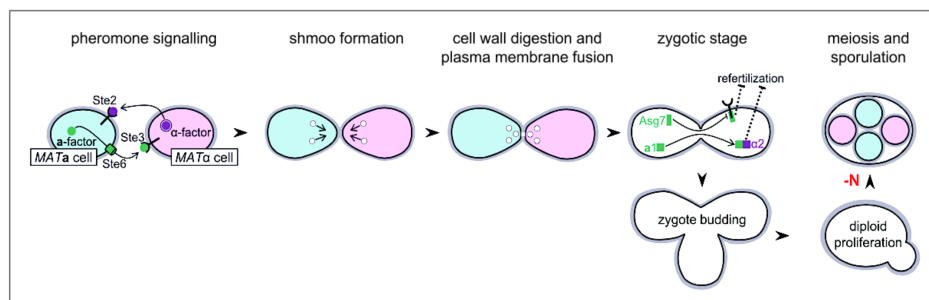


Figura 1.1. Ciclo biologico di *Saccharomyces cerevisiae*. Il lievito *S. cerevisiae* si propaga vegetativamente



come aploide  $MATa$  e  $MAT\alpha$  o come diploide  $MATa/\alpha$ , generato dalla coniugazione di cellule aploidi di mating type opposto. © 2014 The Authors. FEMS Microbiology Reviews published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Federation of European Microbiological Societies.

La comunicazione cellulare avviene mediante un meccanismo di segnalazione tra due cellule di mating type opposto che si basa sui feromoni, e può avvenire solamente durante la fase G1 del ciclo cellulare, in cui le cellule sono sensibili al segnale del feromone (B. Sieber et al, 2022). Ogni tipo cellulare aploide secerne infatti un piccolo feromone peptidico, fattore- $a$  e fattore- $\alpha$ , che si lega ai corrispondenti recettori presenti sulla superficie delle cellule del tipo sessuale opposto. Come schematizzato in Figura 1.2, il legame con il feromone provoca il ri-orientamento verso il potenziale partner di accoppiamento (Casselton, 2002): le cellule si fermano nella fase G1 e subiscono una crescita polarizzata (*shmooing*). Al contatto cellula-cellula, la parete cellulare viene digerita localmente e le membrane plasmatiche si fondono, formando così lo zigote. A questo punto la cellula diploide non è più in grado di accoppiarsi e subisce, a seconda delle condizioni ambientali, la crescita per gemmazione o la sporulazione (se mancano fonti di carbonio o azoto).

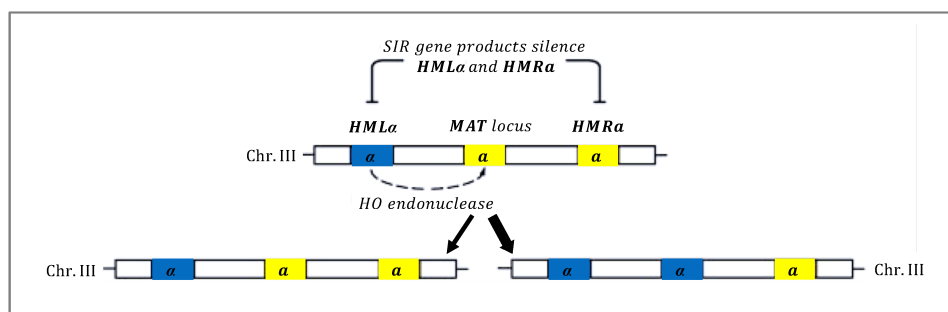


**Figura 1.2. Coniugazione in *S. cerevisiae*.** Le cellule di lievito aploidi scambiano segnali peptidici (feromoni), che portano alla transizione morfologica delle cellule (*shmoo*). Al contatto cellula-cellula, si forma una cellula diploide. In carenza di azoto (-N), le cellule diploidi entrano in fase meiotica (sporulazione). © 2022 The Author(s). Seminars in Cell & Developmental Biology. A focus on yeast mating: From pheromone signaling to cell-cell fusion. Published by Elsevier Ltd.

Il tipo sessuale ( $a$  o  $\alpha$ ) delle cellule aploidi è determinato dalla diversa configurazione genomica di uno specifico locus genetico (i.e.,  $MAT$ ), localizzato al centro del braccio destro del cromosoma III, a ~100 kb sia dal centromero che dal telomero. I due alleli  $MATa$  e  $MAT\alpha$  differiscono di ~700 bp e regolano processi importanti dell'attività cellulare (Lee and Haber, 2015), mediate dall'azione delle proteine  $a1$ , codificata dall'allele  $MATa$ , e le proteine  $\alpha1$  e  $\alpha2$ , codificate da  $MAT\alpha$ . Tali proteine contengono domini di legame al DNA, e regolano l'espressione di geni  $a$ -specifici e  $\alpha$ -specifici. La proteina costitutivamente espressa Mcm1, in combinazione con  $\alpha1$  e  $\alpha2$ , attiva rispettivamente la trascrizione di una serie di geni  $\alpha$ -specifici, inclusi quelli che codificano per il fattore- $\alpha$  e per il recettore transmembrana (Ste3), e reprime i geni  $a$ -specifici. Allo stesso modo, il fattore  $a1$  promuove l'espressione del recettore Ste2 e del fattore- $a$  (M. P. Scott et al., 2004).

I lieviti aploidi sono comunque in grado di mutare il loro *mating type*, modificando l'informazione genetica contenuta nel locus *MAT*. Oltre al locus *MAT* attivo, infatti, il cromosoma III contiene una copia silente dell'allele *MAT $\alpha$*  nel locus *HML* (*Hidden Mat Left*) ed una copia silente di *MAT $\alpha$* , ospitata dal locus *HMR* (*Hidden Mat Right*), necessari affinché la cellula possa cambiare il suo tipo sessuale (Belton J.M. et al., 2015). Come mostrato in Figura 1.3, la commutazione del *mating type* viene avviata da una specifica endonucleasi (i.e., *HO*), che genera una rottura del doppio filamento del DNA nel locus *MAT*, promuovendone il riparo mediante ricombinazione, utilizzando *HML $\alpha$*  oppure *HMR $\alpha$*  come sequenza donatrice (Haber, 2012). Il locus che viene trascritto non è casuale, ma regolato da un gene *enhancer* di ricombinazione (RE): in funzione del *mating type* corrente, nelle cellule *a* il fattore di trascrizione Mcm1 si lega a RE e promuove la trascrizione di *HML $\alpha$* ; nelle cellule  $\alpha$  il legame di Mcm1 con il repressore  $\alpha 2$  provoca la repressione di RE, con un uso estremamente ridotto di *HML* che favorisce *HMR $\alpha$*  (Szeto L. et al, 1997).

A seconda della loro capacità di cambiare il *mating type*, i ceppi di *S. cerevisiae* si distinguono in omotallici ed eterotallici. Le spore aploidi dei ceppi omotallici sono in grado di commutare tipo sessuale, potendo dare origine ad una progenie diploide e costituiscono la maggior parte degli isolati naturali (Landry et al., 2006). Questa potenzialità, che rappresenta un notevole vantaggio in natura promuovendo lo stato diploide più adattabile, è resa possibile dalla presenza nel genoma dei lieviti omotallici di (almeno) una copia funzionale del gene *HO*, che codifica per l'endonucleasi responsabile della conversione allelica del locus *MAT*. Esso viene espresso solo nella cellula madre, in modo che la cellula progenitrice cambi tipo sessuale fondendosi immediatamente con la cellula figlia appena generata (Klar A.J., 1987). La fase aploide, dunque, nei ceppi omotallici è estremamente transitoria, perché le spore vanno incontro ad auto-diploidizzazione dopo appena qualche divisione cellulare. I ceppi eterotallici, invece, possiedono una versione inattiva di questo gene, che porta alla produzione di spore vitali stabilmente aploidi, ovvero in grado di generare lieviti diploidi solo attraverso la coniugazione tra spore di *mating type* opposto che si trovano ad una certa prossimità.



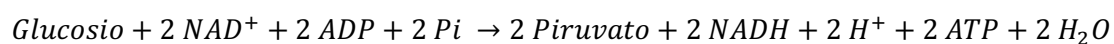
**Figura 1.3. Regolazione del locus *MAT* in *Saccharomyces cerevisiae*.** Disposizione dei loci per il tipo sessuale sul cromosoma III di lievito. I geni silenziati del tipo sessuale si trovano nel locus *HML* ( $\alpha$ ) e *HMR* ( $\alpha$ ). Le cellule aploidi possono cambiare *mating type* in un processo che trasferisce la sequenza del DNA da

## 1.2 METABOLISMO

*Saccharomyces cerevisiae* è un organismo mesofilo anaerobio facoltativo, in grado di cambiare la propria attività metabolica in funzione della presenza di ossigeno e della concentrazione di glucosio nell'ambiente di crescita (Suzzi e Tofalo, 2018). In condizioni aerobiche nella cellula viene favorita la respirazione, energeticamente più proficua, a discapito della fermentazione. La respirazione aerobica prevede il coinvolgimento dei processi metabolici di glicolisi, ciclo di Krebs e fosforilazione ossidativa, con la conversione di una molecola di glucosio in diossido di carbonio, acqua ed una resa energetica di 38 molecole di ATP. In condizioni anaerobiche, o con concentrazioni di zucchero superiori a 9 g/l, le cellule di *S. cerevisiae* utilizzano preferenzialmente la fermentazione alcolica, con la produzione, a partire da zuccheri esosi, di diossido di carbonio, etanolo e 2 molecole di ATP. In questo senso, utilizzando come substrato un mosto d'uva, con un tenore in zuccheri superiore a 150 g/l, la via metabolica utilizzata dal lievito è sempre quella fermentativa.

### 1.2.1 FERMENTAZIONE ALCOLICA

Una delle caratteristiche più importanti del lievito *S. cerevisiae*, protagonista da secoli sulla scena dei prodotti fermentati, è la capacità di convertire rapidamente gli zuccheri in etanolo e anidride carbonica. Dopo l'entrata degli zuccheri nella cellula per diffusione facilitata, la via metabolica si compone di due fasi distinte: la glicolisi e la fermentazione. La via glicolitica consta di una serie di reazioni enzimatiche che portano alla produzione di 2 molecole di ATP e 2 di piruvato per ogni molecola di glucosio, con utilizzo del cofattore  $NAD^+$ . La reazione complessiva può essere resa con la seguente equazione:



Per permettere un nuovo ciclo di glicolisi, il NADH deve essere riossidato a  $NAD^+$ , la cui disponibilità nella cellula è limitata. Questo si ottiene nella fase di fermentazione, quando il piruvato, prodotto dalla glicolisi, viene ridotto dal NADH ai prodotti di fermentazione etanolo e diossido di carbonio. In particolare, la fermentazione alcolica si articola in due reazioni sequenziali, catalizzate dagli enzimi piruvato decarbossilasi, che decarbossila il piruvato ad acetaldeide liberando  $CO_2$ , e l'alcol deidrogenasi, che riduce l'acetaldeide a spese del NADH, producendo infine  $NAD^+$  ed etanolo.

Seppure il decorso della fermentazione sia influenzato da numerosi fattori, come temperatura, disponibilità di nutrienti, caratteristiche proprie del mosto e fattori legati al ceppo, *Saccharomyces cerevisiae* si distingue per essere il lievito più utilizzato in enologia, data la sua elevata attitudine fermentativa anche in ambienti selettivi, come può essere il mosto d'uva, la sua notevole resistenza all'etanolo ed ai solfiti, nonché il considerevole potere alcoligeno (Aranda et al., 2011).

### 1.2.2 IL MOSTO D'UVA, SUBSTRATO DI FERMENTAZIONE

Il mosto d'uva è il prodotto liquido che si ricava da processi di pigiatura o torchiatura di acini di uva fresca, avente una gradazione alcolica naturale non inferiore all'8% in volume. Come accennato nel paragrafo precedente, *S. cerevisiae* è in grado di crescere con elevato vigore fermentativo nell'ambiente altamente selettivo che è il mosto d'uva, sovrastando la microflora costituita da batteri e lieviti non-*Saccharomyces*, naturalmente presente sugli acini d'uva. Il tenore di zuccheri nel mosto, parametro che determina la quantità di alcol al termine della fermentazione, è piuttosto elevato: si aggira tra i 170 e i 220 g/l (Ribereau-Gayon et al., 2006), dei quali la maggior parte è rappresentata da fruttosio e glucosio, in rapporto di 1:1 a maturazione completa dell'uva (Waterhouse A.L. et al., 2016). In concentrazioni minori si trovano anche zuccheri mono- e poli-saccaridi, non fermentescibili e non assimilabili dai lieviti. Quantità di zucchero superiori a 250-300 g/l possono inibire la crescita dei lieviti a causa dell'elevata pressione osmotica e delle alte concentrazioni di etanolo intracellulare (Nishino et al., 1985), mentre concentrazioni di zuccheri basse, tipiche delle aree viticole settentrionali, non ne limitano la crescita, ma influenzano il potenziale alcolico finale (Carrascosa et al., 2011).

I principali acidi organici, secondi per abbondanza nel mosto dopo acqua e zuccheri, sono l'acido tartarico, malico, citrico, ed ascorbico; tali acidi non hanno alcun effetto diretto sulla crescita del lievito, ma svolgono un ruolo decisivo nella determinazione del pH del mosto (Carrascosa et al., 2011), che è essenziale rimanga basso (2,8-4,3) allo scopo ridurre l'eventuale presenza di microrganismi indesiderati e patogeni (Ribereau-Gayon et al., 2007; Cabras, 2004). Sono presenti anche l'acido lattico, derivante, con l'ascorbico, dal metabolismo di lieviti e batteri e l'acido acetico, un prodotto secondario della fermentazione alcolica e che deve essere presente in basse concentrazioni (0,2-0,3 g/l) per non alterare il prodotto conferendo odori pungenti all'olfatto. Le concentrazioni totali di acidi organici si attestano sui 9-27 g/l (Ough, 1992).

Il contenuto di azoto riveste una certa importanza nel mosto poiché influenza la crescita cellulare, la velocità di fermentazione e la tolleranza all'etanolo, tendendo a limitare la crescita di *S. cerevisiae*

(*Ingledeew and Kunkee*, 1985), e costituisce la principale causa di arresto fermentativo (*Bisson*, 1999). I composti azotati comprendono ammoniaca (3-10%), amminoacidi (25-30%), polipeptidi (5-10%), proteine (5-10%) e quantità minori di nitrati, nucleotidi, ammine e vitamine (*Carrascosa et al.*, 2011). *S. cerevisiae* non è in grado di assimilare né l'azoto in forma inorganica, né le proteine e i polipeptidi, a causa della scarsa abilità proteolitica extracellulare; in conseguenza di ciò, il lievito dipende dalla concentrazione di ammonio e amminoacidi (*Ough and Amerine*, 1988). È stato riportato, in particolare, che concentrazioni di azoto assimilabile inferiori a 140 mg/l possono compromettere la fermentazione a concentrazioni zuccherine normali (*Bely et al.*, 1990), ed una concentrazione di ioni ammonio inferiore a 25 mg/l sia generalmente considerata non desiderabile. Per questo, è consentita l'aggiunta di diammonio fosfato (DAP) nel mosto, fino a 3 g/l (OIV Code Sheet – Issue 2021/01). Va comunque ricordato che l'esito è strettamente dipendente dal ceppo di lievito impiegato nella fermentazione (*Carrascosa et al.*, 2011).

Nel mosto sono presenti anche diversi composti fenolici, elementi essenziali per determinare il carattere organolettico del vino (*Waterhouse*, 2002), così come sali minerali e steroli, fondamentali per la biosintesi lipidica e delle membrane cellulari.

Nel processo produttivo del vino i lieviti contribuiscono in maniera netta anche alle caratteristiche organolettiche: molti metaboliti secondari rilasciati durante la fermentazione, infatti, contribuiscono a determinare il *flavour* finale del prodotto, conferendovi sentori aromatici caratteristici che dipendono dalla natura e dalla concentrazione delle molecole, diversamente ricercati a seconda della tipologia di vino.

### **1.2.3 ACIDO ACETICO**

L'acido acetico è un sottoprodotto della fermentazione alcolica di *Saccharomyces cerevisiae* ed il componente principale dell'acidità volatile nei mosti d'uva e dei vini (*Vilela-Moura et al.*, 2011). Insieme ad alte concentrazioni di etanolo ed altri metaboliti tossici, l'acido acetico può contribuire a determinare l'arresto della fermentazione e alla riduzione della produzione volumetrica di etanolo (*Mira N.P. et al.*, 2010). Può formarsi come sottoprodotto della fermentazione alcolica o come prodotto del metabolismo dei batteri acetici e lattici, che possono metabolizzare gli zuccheri residui, aumentando l'acidità volatile (*Vilela-Moura et al.*, 2011). L'acidità volatile si distingue in volatile, fissa e totale, e concerne gli acidi volatili presenti nel vino, come quello acetico, formico, propionico e butirrico. Il componente principale dell'acidità volatile è l'acido acetico, che tipicamente si trova a concentrazioni comprese tra 0,2-0,6 g/l; la soglia massima imposta dall'UE è di 1,08 g/l nei vini

bianchi e 1,20 g/l nei rossi (OIV, 2010). Sebbene sia necessaria una concentrazione di acido acetico di almeno 0,90 g/l affinché venga percepito un notevole retrogusto amaro e acido nel vino, che non causa tuttavia un odore forte (Ribéreau-Gayon et al., 2006a), diminuirne le concentrazioni in alcuni ceppi è un miglioramento interessante per l'industria enologica.

Studi sulla produzione di acidità volatile da parte di *S. cerevisiae* in condizioni di vinificazione hanno mostrato che l'acido acetico si forma principalmente all'inizio della fermentazione alcolica (Alexandre et al., 1994; Coote and Kirsop, 1974) e che la sua produzione è influenzata da diversi fattori, come il ceppo di lievito, la composizione del mosto e le condizioni di fermentazione (Barbosa et al. 2009; Vilanova et al. 2007).

Gli effettivi percorsi biochimici che contribuiscono alla formazione dell'acido acetico nel vino non sono stati ancora del tutto delucidati (Ribéreau-Gayon et al., 2006b); tuttavia, è stato suggerito che diverse reazioni enzimatiche contribuiscano alla sua formazione. L'acido acetico può essere prodotto per idrolisi dell'acetil-CoA, proveniente dalla decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico da parte del complesso della piruvato deidrogenasi; reazione questa, che si svolge nei mitocondri ed è limitata in anaerobiosi (Ribéreau-Gayon et al., 2007). In alternativa, l'acido acetico può provenire anche dall'ossidazione dell'acetaldeide da parte dell'aldeide deidrogenasi; enzima, questo, che ha come cofattore NADP<sup>+</sup> ed è attivo durante la fermentazione alcolica. Questa via serve a formare acetil-CoA da parte dell'acetil-CoA sintetasi, quando il complesso dell'aldeide deidrogenasi è represso: per questo, i ceppi di lievito che producono le minori quantità di acido acetico sono quelli in cui l'attività acetil-CoA sintetasica è più elevata (Verduyn et al., 1990).

Le condizioni pratiche di vinificazione che possono condurre a tenori elevati di acido acetico da parte di *S. cerevisiae* comprendono, com'è noto, un elevato tenore iniziale di zuccheri fermentati: più elevato è il contenuto di zuccheri del mosto, più il lievito produce acido acetico (Ribéreau-Gayon et al., 2007). Questo fenomeno si deve all'adattamento ad un mezzo con alta concentrazione di zuccheri; le cellule, infatti, per controbilanciare la pressione osmotica aumenteranno l'accumulo intracellulare di glicerolo (Blomber and Adler, 1992), portando, a cascata, ad una maggiore trascrizione dei geni implicati nella formazione di glicerolo (GDP1), ma anche di acetato (ALD2, ALD3) (Attfield et al., 2000). Altra condizione che svolge un ruolo importante in questa stimolazione è l'azoto assimilabile nel mosto, che per limitare la produzione di acido acetico deve essere intorno a 190 mg/l (Ribéreau-Gayon et al., 2007); condizione, questa, che può essere raggiunta aggiungendo solfato di ammonio a inizio fermentazione. Più in generale, altri fattori di vinificazione favorevoli alla produzione di acido acetico sono l'anaerobiosi, valori di pH inferiori a 3 o superiori a 4, carenze in amminoacidi e

in vitamine nel mosto, temperature troppo elevate (da 25 a 30 °C) durante la fase di moltiplicazione dei lieviti (*Ribéreau-Gayon et al.*, 2007).

### 1.3 MIGLIORAMENTO GENETICO: IBRIDAZIONE

L'obiettivo del miglioramento genetico dei ceppi industriali di lievito è quello di modificarne il genoma allo scopo di rendere il processo di fermentazione più efficiente e/o i prodotti più desiderabili e utili (*Spencer J.F.T. and Spencer D.M.*, 1997). L'ibridazione intraspecifica può essere vista come un potente strumento di sviluppo dei ceppi di lievito enologici, consentendo la combinazione e il miglioramento delle caratteristiche fenotipiche di ceppi parentali selezionati per il possesso di un fenotipo interessante. Inoltre, questi nuovi ceppi ibridi possono essere generati senza l'uso di modificazioni genetiche mirate, il cui uso nell'industria rimane ancora limitato a causa delle normative e dell'opinione pubblica (*Twardowski and Malyska*, 2015; *Krogerus K. et al.*, 2017). La tecnica di ibridazione classica risale agli studi pionieristici di Winge e Laustsen (1937), che hanno portato alla produzione di ibridi incrociando ceppi aploidi di *mating type* opposti. La facilità nell'applicabilità di questo approccio, tuttavia, dipende dal ciclo sessuale dei ceppi parentali. Se entrambi i ceppi parentali sono eterotallici, è possibile eseguire uno *screening* dei segreganti aploidi stabili di entrambi i genitori, per poi selezionarne i migliori ed attuare l'esperimento di ibridazione (*Steeensel J. et al.*, 2014). Questa tecnica è stata perfezionata da Lindegren nel 1949, che si occupò, appunto, di incrociare le ascospore stabilmente aploidi semplicemente unendo le colture cellulari dei due genitori con l'ausilio di un micromanipolatore. Per i ceppi omotallici, tuttavia, che costituiscono la maggior parte dei ceppi industriali, devono essere utilizzate strategie diverse a causa del fenomeno di auto-diploidizzazione delle spore aploidi (*Bakalinsky A.T. et al.*, 1990; *Romano P. et al.*, 1985), come descritto in precedenza. Per operare un incrocio tra ceppi omotallici, infatti, è necessario passare dalla tecnica di coniugazione tra spore, un processo lungo e complicato, che oltretutto non assicura l'ottenimento di un ibrido di successo. L'incrocio è comunque possibile ponendo, con uso di un micromanipolatore, due spore dei ceppi da ibridare l'una accanto all'altra su una superficie di agar e monitorando l'evento di ibridazione mediante microscopia, per poi isolare gli zigoti eventualmente generati (*Steeensel J. et al.*, 2014). Questo metodo, come altri utilizzati per la generazione di ibridi, necessita dell'utilizzo di marcatori di selezione, che devono essere presenti e distinguibili nei ceppi di partenza e che permetteranno di discriminare gli ibridi dalle popolazioni parentali (*Krogerus K. et al.*, 2017). A seconda del fenotipo mirato, la fase di selezione può essere semplice o estremamente laboriosa (*Steeensel J. et al.*, 2014); ad esempio, l'utilizzo di mutanti con un metabolismo alterato è una tecnica ampiamente utilizzata, della quale gli esempi più noti riguardano l'isolamento di mutanti difettosi per i geni *URA3* o *LYS2* che, posti in terreni appositi, non accumuleranno composti tossici

normalmente convertiti dai geni citati (*Zaret and Sherman, 1985; Boeke et al., 1987*). Tuttavia, non sempre è facile effettuare uno *screening* di questo tipo sulla popolazione ibrida e in ogni caso si rende necessario sottoporre i ceppi generati a prove di fermentazione, per selezionare gli ibridi a più rapido accrescimento e più adattati ad eventuali condizioni di stress in fase fermentativa. Un ulteriore fattore che limita questa metodologia è il rischio legato al successo dall'incrocio, rispetto al fenotipo desiderato e quello effettivamente mostrato dagli ibridi, determinato dal tasso di ricombinazione e riassortimento dei geni parentali (*Attfield and Bell, 2003*). Inoltre, i lieviti enologici industriali spesso presentano anomalia nella loro ploidia, risultando in una difficoltà di sporulazione o nella produzione di spore con bassa vitalità (*Spencer J.F.T. and Spencer D.M., 1997*). Nonostante tali difficoltà, l'accoppiamento diretto di ceppi industriali con ibridazione classica rappresenta attualmente l'unica modalità consentita ed utilizzata per ottenere ceppi ibridi (non-OGM) in ambito industriale (*Sipiczki, 2008*). Generalmente, il tempo necessario ad ottenere e caratterizzare un nuovo ibrido con le procedure tradizionali si aggira oggi intorno ai 2-3 anni, prima dei quali è difficile valutare se l'incrocio abbia avuto il risultato desiderato.



## 2. SCOPO DELLA TESI

Questo progetto di Tesi si costruisce su un rapporto di collaborazione tra il Laboratorio di Genetica del Lievito del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Padova e l'Azienda Italiana Biotecnologie S.r.l. di Montebello Vicentino, nel contesto “ricerca & sviluppo” finalizzato al miglioramento di ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* in ambito enologico.

Lo scopo finale di questa Tesi consiste nel tentativo di attenuare uno specifico carattere negativo del lievito enologico mPIETRA05, ovvero la produzione piuttosto elevata di acido acetico, attraverso l'incrocio con il ceppo SPLZ07, selezionato tra quelli della collezione dell'Azienda partner del progetto. Rispetto alle tecniche normalmente utilizzate, l'ibridazione verrà effettuata mediante una procedura basata sull'ingegneria genetica, in grado di ridurre notevolmente il tempo necessario a generare gli ibridi da ceppi di lievito omotallici.

Per l'Azienda partner, i risultati di questa Tesi forniranno informazioni indispensabili per valutare se l'incrocio tra i due ceppi si possa definire interessante e promettente: con la strategia di incrocio qui proposta, il tempo necessario per ottenere tali informazioni dovrebbe consistere di qualche mese, invece degli anni richiesti dalle tecniche classiche.

### 3. MATERIALI E METODI

Le prove sperimentali eseguite in questo lavoro di Tesi sono state eseguite presso il Laboratorio di Genetica del Lievito nel Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Padova per quanto concerne gli approcci di tipo genetico e molecolare; presso i Laboratori dell'Azienda Italiana Biotecnologie S.r.l. a Montebello Vicentino (VI) per le prove di carattere enologico.

#### 3.1 MICRORGANISMI UTILIZZATI

Per le prove sperimentali eseguite in questa Tesi, sono stati utilizzati i ceppi di lieviti e batteri mostrati nella tabella sottostante (Tabella 3.1).

Microrganismi utilizzati	
<b>Ceppo di <i>Escherichia coli</i></b>	<b>Genotipo</b>
<b>TOP10 <i>E. coli</i></b>	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math> (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>
<b>Ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>Genotipo</b>
<b>SPLZ07</b>	<i>wild-type (wt)</i> , diploide
<b>mPIETRA05</b>	<i>wild-type (wt)</i> , diploide
<b>W303</b>	<i>wild-type (wt)</i> , diploide aploide, MAT $\alpha$ aploide, MAT $\alpha$

Tabella 3.1. Ceppi di batteri e lievito utilizzati.

#### 3.2 TERRENI DI COLTURA E MOSTO UTILIZZATI

Le composizioni dei terreni di coltura utilizzati per coltivare i microrganismi, sia in forma liquida che solida, sono riportati nella Tabella 3.2.

Terreni di coltura per batteri	
<b>LB (Luria-Bertani)</b>	Yeast Extract 0,5%
	Bacto Triptone 1%
	NaCl 0,5%
	Ampicillina 100 $\mu$ g/ml, se necessario
	Agar 2%, se solido
	H <sub>2</sub> O MilliQ a volume

<b>Terreni di coltura per lieviti</b>	
<b>Terreno ricco YPGA</b>	Yeast Extract 1%
	Bacto Peptone 1%
	Glucosio 2%
	Adenina 0,01%
	Agar 2%, se solido
	H <sub>2</sub> O MilliQ a volume
<b>Terreno ricco YPGA+NAT</b>	Yeast Extract 1%
	Bacto Peptone 1%
	Glucosio 2%
	Adenina 0,01%
	Agar 2%, se solido
	Nurseotricina 100 µg/ml
	H <sub>2</sub> O MilliQ a volume
<b>Terreno ricco YPGA+HYGRO</b>	Yeast Extract 1%
	Bacto Peptone 1%
	Glucosio 2%
	Adenina 0,01%
	Agar 2%, se solido
	Igromicina 200 µg/ml
	H <sub>2</sub> O MilliQ a volume
<b>Terreno ricco YPGA+NAT+HYGRO</b>	Yeast Extract 1%
	Bacto Peptone 1%
	Glucosio 2%
	Adenina 0,01%
	Agar 2%, se solido
	Nurseotricina 100 µg/ml Igromicina 200 µg/ml
	H <sub>2</sub> O MilliQ a volume
<b>Terreno sporulazione Agar+K-Ac 1%</b>	K-acetato 1%
	Agar 2%
	H <sub>2</sub> O MilliQ a volume

**Tabella 3.2. Formulazione dei terreni di coltura utilizzati.**

Tutti i terreni di coltura utilizzati sono stati preparati unendo le polveri, fino a completo scioglimento in acqua MilliQ, aggiunta fino ad arrivare a volume. I terreni vengono quindi sterilizzati in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Per quanto riguarda i terreni liquidi, si conservano a temperatura ambiente; i terreni solidi vengono invece fatti raffreddare in agitazione fino ad approssimativamente 15 °C, per poi essere colati in piastre Petri (25 ml l'una). Per gli altri terreni, se è previsto che contengano un

antibiotico, questo viene aggiunto in seguito alla sterilizzazione in autoclave, quando il terreno si è raffreddato. Una volta solidificato il terreno, le piastre sono conservate a 4 °C.

Per lo svolgimento delle prove di fermentazione è stato utilizzato il mosto d'uva Pignoletto desolforato, derivante dalla zona di Modena, Emilia Romagna. Alle misurazioni di partenza presentava 14 °Babo, quindi un potenziale di grado alcolico pari a 9,06 % (v/v). Il mosto è stato preparato per le prove fermentative aggiungendo quantità definite di zuccheri (per metà glucosio, per metà fruttosio) per arrivare ad un °Babo di 19 (EtOH % potenziale di 13,04). Inoltre, sono stati aggiunti i nutrienti autolisato (D100) e diammonio fosfato (DAP), rispettivamente nelle quantità di 0,2 g/l e di 0,1 g/l. Dopo il completo dissolvimento degli zuccheri aggiunti e delle polveri, il mosto preparato è stato aliquotato nelle bottigliette di fermentazione in volumi pari a 175 ml ognuna.

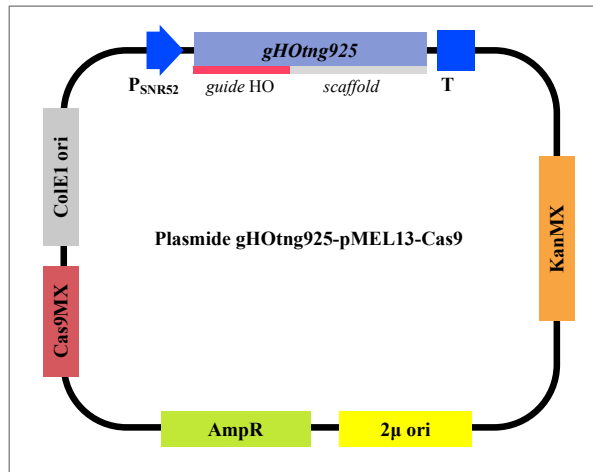
### 3.3 ANALISI GENETICHE E MOLECOLARI

#### 3.3.1 PLASMIDI

In questo lavoro di Tesi sono stati utilizzati tre diversi plasmidi di espressione per lievito:

- I. **Plasmide gHOtng925-pMEL13-Cas9**, usato per la trasformazione dei ceppi SPLZ07 e mPIETRA05. Già disponibile in Laboratorio, il plasmide gHOtng925-pMEL13-Cas9 (Figura 3.1) è stato impiegato per operare le modificazioni genetiche in cellule di lievito dei lieviti *wild-type*. Si tratta di un plasmide di circa 11'000 bp e deriva dal vettore pMEL13 (*Addgene plasmid #107919*) descritto da *Mans et al.* (2015); presenta i seguenti elementi funzionali:

- Sequenza *ColE1 ori*: origine di replicazione di *E. coli*, per la sua propagazione in batteri;
- Sequenza *2μ ori*: origine di replicazione per la sua propagazione in lievito;
- *AmpR*: cassetta di espressione che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina, marcatore di selezione utilizzato per la crescita batterica;
- *KanMX*: cassetta di espressione che conferisce resistenza all'antibiotico gentamicina (G418), marcatore di selezione per il lievito;
- *Cas9MX*: cassetta di espressione per l'endonucleasi Cas9 del batterio *Streptococcus pyogenes*;
- gHOtng925: cassetta di espressione per la molecola di RNA guida (bersaglio), localizzata nella regione codificante del gene *HO* di *S. cerevisiae*.



**Figura 3.1. Rappresentazione grafica del plasmide gHOTng925-pMEL13-Cas9.**

- II. **Plasmide pMEL12** (*Addgene plasmid #107918*), contiene la cassetta di espressione per la resistenza all'antibiotico igromicina, marcatore di selezione per i lieviti modificati del ceppo SPLZ07. È stato usato come stampo nelle reazioni di PCR per l'amplificazione della cassetta HygR.
- III. **Plasmide pMEL15** (*Addgene plasmid #107921*), è stato usato come stampo per l'amplificazione della cassetta NatR, che conferisce resistenza all'antibiotico nurseotricina come marcatore di selezione per i lieviti ingegnerizzati del ceppo mPIETRA05.

### 3.3.2 PCR

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) è una tecnica molecolare che consente di ottenere *in vitro* l'amplificazione esponenziale di una sequenza specifica di materiale genetico, ricavandone in questo modo un elevato numero di copie. L'amplificazione richiede il riconoscimento delle estremità della sequenza nucleotidica di interesse da parte di primer, oligonucleotidi complementari alle estremità della sequenza target, che si affiancano ad essa determinando quindi l'innesco dell'amplificazione. Si necessita, inoltre, di un altro reagente fondamentale: la Taq polimerasi, enzima responsabile della sintesi di nuovi acidi nucleici, che andranno a costituire il neo-filamento. Perché la polimerasi possa lavorare, è necessario aggiungere alla reazione DNA stampo, i già citati primer *forward* e *reverse* (rispettivamente complementari all'estremità 5' ed all'estremità 3' del segmento da amplificare), buffer di reazione, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, acqua sterile.

La reazione produce una quantità elevata di dsDNA ed avviene in un termociclatore, strumento che porta a temperature diverse le tre fasi di reazione, ripetute dalle 30 alle 40 volte. La prima è una fase di denaturazione (94-99 °C), in cui i filamenti di DNA stampo si separano, generandone quindi due

singoli. La fase seguente è di *annealing* (45-60 °C): i primer si appaiano alle regioni complementari presenti sul DNA denaturato. La terza e ultima fase è di estensione (72 °C), a questo punto la polimerasi aggiunge i dNTPs forniti nella reazione alle estremità 3' dei primer, consentendo quindi la sintesi di nuovi filamenti, complementari a quelli utilizzati da stampo.

Per le PCR eseguite a fine diagnostico, ossia l'analisi del locus *HO*, è stata utilizzata la Taq polimerasi GoTaq Promega Hot Start. La stessa polimerasi è stata utilizzata per le PCR di amplificazione delle cassette di resistenza NatR (nurseotricina) e HygR (igromicina). Per le PCR realizzate per l'amplificazione del riparo da inserire tramite CRISPR-Cas9 nel genoma del lievito è stata utilizzata la CloneAmp™ HiFi Polymerase (*Takara Bio*).

Le reazioni sono state allestite come riportato in Tabella 3.3, 3.4, 3.5.

Reagenti	[finale]	Costruzione riparo HygR	Costruzione riparo NatR
template dsDNA	1 ng/μl	pMEL12 (20 ng/μl)	pMEL15 (20 ng/μl)
primer <i>forward</i>	0,5 -1 μM	HO Rep NatR For	HO Rep NatR For
primer <i>reverse</i>	0,5 -1 μM	HO Rep Hyg Rev	HO Rep NatR Rev
Buffer	1x	CloneAmp HiFi PCR Premix	5x Taq Buffer
MgCl <sub>2</sub>	1,5-2 mM		MgCl <sub>2</sub>
dNTPs	0,2 mM		dNTPs mix
Taq polimerasi	1 U/μL		GoTaq Promega Hot Start
ddH <sub>2</sub> O	<i>a volume</i>	<i>a volume</i>	<i>a volume</i>
Step	Cicli	Tempo e temperatura	Tempo e temperatura
Denaturazione iniziale	1	98° per 2'	95° per 2'
Denaturazione <i>Annealing</i> Estensione	35	98° per 10" 55° per 15" 72° per 1'	95° per 30" 68° per 30" 72° per 1'30"
Estensione finale	1	72° per 1'	72° per 3'

**Tabella 3.3. Protocolli di PCR per la costruzione del dsDNA di riparo.** Nella prima colonna sono indicati i reagenti, nella seconda sono riportate le concentrazioni finali di una reazione di amplificazione generale; nelle successive i protocolli svolti per amplificare la cassetta HygR e NatR, rispettivamente di resistenza a igromicina e nurseotricina.

Reagenti	[finale]	CONTROLLO locus $\Delta HO$	CONTROLLO cassetta HygR	CONTROLLO cassetta NatR
template dsDNA	1 ng/ $\mu$ l	genomico SPLZ07 wt+ $\Delta HO$ mPIETRA05 wt+ $\Delta HO$	genomico SPLZ07 wt+ $\Delta HO$	genomico mPIETRA05 wt+ $\Delta HO$
primer forward	0,5 -1 $\mu$ M	HO Rep NatR For	HO Rep NatR For	HO Rep NatR For
primer reverse	0,5 -1 $\mu$ M	dgHORev	HO Rep Hyg Rev	HO Rep NatR Rev
Buffer	1x	5x Taq Buffer	5x Taq Buffer	5x Taq Buffer
MgCl <sub>2</sub>	1,5-2 mM	MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>
dNTPs	0,2 mM	dNTPs mix	dNTPs mix	dNTPs mix
Taq polimerasi	1 U/ $\mu$ L	GoTaq Promega Hot Start	GoTaq Promega Hot Start	GoTaq Promega Hot Start
ddH <sub>2</sub> O	a volume	a volume	a volume	a volume
Step	Cicli	Tempo e temperatura	Tempo e temperatura	Tempo e temperatura
Denaturazione iniziale	1	95° per 2'	95° per 2'	95° per 2'
Denaturazione Annealing Estensione	35	95° per 15'' 60° per 20'' 72° per 3'	95° per 30'' 61° per 30'' 72° per 2'	95° per 30'' 68° per 30'' 72° per 1'30''
Estensione finale	1	72° per 3'	72° per 3'	72° per 3'

**Tabella 3.4. Protocolli di PCR diagnostiche effettuate per il controllo di amplificazione del locus *HO* deleto e delle cassette di resistenza agli antibiotici igromicina e nurseotricina. La seconda colonna presenta le concentrazioni finali di una reazione generale, la successiva i protocolli svolti per amplificare le cassette HygR e NatR di resistenza.**

Nella tabella che segue (Tabella 3.5) sono indicate le sequenze dei primer utilizzati nelle prove sperimentali.

Nome primer	Sequenza, 5'-3'	len (bp)
dgHOFor	GCTGGGCGTTATTAGGTGTG	20
dgHORev	ACCAAGGCCATGTCTTCTCG	20
HO Rep NatR For	AAATGCGAAAAATCTGGGGTCTCTACCTTACGGTTTGTGACGAT CACGACATGGAGGCCAGAATACCCTCC	71
HO Rep NatR Rev	GAATTGCTATTTTATAAGATTCAGGGCCTTCGCCCTTTTTCACA ACCCGGTAGAGGTGTGGTCAATAAGAGC	72
HO Rep Hyg Rev	ATTTTACTTTTATTACATACTTTTAACTAATATACACAT CTTCGAGCGTCCCAAAACCTTCTCAAGC	72

**Tabella 3.5. Nomi, sequenze e lunghezze in paia di basi dei primer utilizzati.**

### 3.3.3 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

L'elettroforesi su gel è una tecnica che permette la separazione di frammenti di DNA mediante l'applicazione di un campo elettrico, che ne causa la migrazione: i frammenti, carichi negativamente, si muovono dai pozzetti di caricamento lungo la matrice di gel verso il polo positivo a velocità diverse, in relazione alla dimensione. Il gel, costituito da una maglia di pori, funge da setaccio permettendo quindi la separazione dei prodotti di PCR in base al loro peso molecolare, dove i frammenti più piccoli si muoveranno più velocemente rispetto ai più grandi. Al termine della corsa elettroforetica il DNA viene visualizzato grazie all'impiego di etidio bromuro, molecola che si intercala nella doppia elica dell'acido nucleico, per emettere poi luce fluorescente in seguito ad irradiazione con luce ultravioletta.

Il gel per la corsa viene preparato sciogliendo agarosio all'1% (p/v) in TBE 0,5X (Tris borato-EDTA: acido borico 90 mM, EDTA sale disodico 2 mM, Tris 90 mM, pH 8) ed aggiungendo etidio bromuro alla concentrazione finale di 0,5 µg/ml. Una volta miscelato, il composto viene colato in un apposito stampo, dotato di un pettine, utile alla formazione dei pozzetti, nei quali andranno caricati i campioni. Una volta polimerizzato, il gel viene posto in una vasca elettroforetica, immerso in TBE 0,5X ed i campioni caricati, oltre ad un *DNA Ladder* (*New England BioLabs*), marcatore di peso molecolare utile a confrontare le lunghezze in paia di basi dei frammenti di corsa. Se necessario, ai prodotti di PCR va aggiunto il buffer di caricamento *Loading Dye Purple 6X* (*New England BioLabs*). Viene quindi applicato un voltaggio di circa 90-100 Volt, per 20-50 minuti a seconda dell'esigenza. Al termine della corsa, i frammenti separati vengono visualizzati mediante illuminazione del gel con luce ultravioletta (300 nm) all'apposito strumento transilluminatore.

### 3.3.4 ESTRAZIONE DNA PLASMIDICO DA BATTERI (MINIPREP)

Per verificare la trasformazione batterica, che dovrebbe essere avvenuta per le colonie di batteri cresciute su piastra selettiva contenente ampicillina, si procede ad estrarre il DNA plasmidico, mediante kit *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (*Sigma-Aldrich*). Sul DNA estratto, poi, verranno effettuati controlli per accertarne la quantificazione e la buona riuscita del clonaggio.

Con il puntale si preleva una colonia scelta per inoculare i batteri in 5 ml di terreno liquido LB, addizionato di 10 µl di ampicillina, per poi essere lasciati crescere *overnight* in agitazione. Il giorno seguente, una volta avvenuta la crescita, gli inoculi vengono risospesi con il vortex e si prelevano 4 ml di coltura in due successivi passaggi da 2 ml; vengono poi centrifugati a 14000 rpm per 5 minuti e successivamente viene eliminato il surnatante. Il pellet rimanente viene quindi risospeso in tre diverse soluzioni in sequenza: il primo passaggio prevede l'aggiunta di 200 µl di soluzione S1 di



risospensione, contenente RNAsi, che causa una permeabilizzazione della membrana cellulare. Vengono poi aggiunti 200 µl di soluzione S2 di lisi, che provoca lisi dei batteri in soluzione alcalina, per poi mescolare il campione per inversione 6 volte. A questo punto vengono aggiunti 350 µl di soluzione S3 di neutralizzazione (potassio acetato 3M, acido acetico 2M), che blocca la lisi cellulare, e mescolato il campione per inversione 6 volte. Successivamente centrifugare il campione a 14000 rpm per 10 minuti, prelevare il surnatante e trasferirlo nelle apposite colonnine fornite dal kit, precedentemente lavate con 500 µl di soluzione “Colon Preparation”. Le colonnine vengono centrifugate 1 minuto a 14000 rpm ed eliminato l’eluato, per poi aggiungere 750 µl di “Wash Solution” contenente etanolo. Le colonnine vengono poi centrifugate per 1 minuto a 14000 rpm per poi eliminare l’eluato; la procedura va ripetuta due volte per rimuovere accuratamente l’etanolo. Infine, le colonnine sono trasferite in una nuova eppendorf, vengono aggiunti 50 µl di ddH<sub>2</sub>O, si centrifuga 2 minuti a 14000 rpm e si elimina la colonnina: l’eluato contiene il DNA plasmidico. A questo punto il DNA plasmidico estratto può essere quantificato al Nanodrop (*Thermo Fischer Scientific*).

### 3.3.5 TRASFORMAZIONE ALTA EFFICIENZA

La trasformazione ad alta efficienza è un protocollo di trasformazione della durata complessiva di 3 giorni, che coinvolge lieviti in fase di crescita. Per i plasmidi ed il riparo, infatti, è più facile interagire ed entrare nelle cellule in questa fase; pertanto, è una tecnica con maggiore probabilità di riuscita rispetto a protocolli di trasformazione più rapidi. Questo tipo di trasformazione si serve del sistema CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and associated Cas system*), una tecnica di *genome editing* che si basa sull’utilizzo di un apparato molecolare composto da una particolare endonucleasi (Cas9) e da una molecola di RNA guida (gRNA), che permette di apportare modifiche mirate in qualsiasi punto del genoma.

Il giorno precedente la trasformazione si inocula il ceppo che si intende trasformare in 5 ml di terreno ricco YPG, per lasciarlo in crescita a 28 °C *overnight* in agitazione. Il mattino seguente l’inoculo, si misura la densità ottica (OD<sub>600nm</sub>) raggiunta con lo spettrofotometro: tenendo conto che si vuole ottenere un OD<sub>600nm</sub> di 0,7-0,8, si reinocula una corretta quantità di campione utilizzando le seguenti formule, partendo da un OD<sub>600nm</sub> pari a 0,15.

$$\alpha = \frac{OD_{iniziale}}{OD_{finale}(= 0,15)} \qquad ml \text{ da reinoculare} = \frac{V_{finale}}{\alpha}$$

Come da protocollo, si trasferiscono 5 ml di coltura per ogni trasformazione in una falcon da 45 ml, si centrifuga a 4000 rpm per 5 minuti e si elimina il surnatante. Si risospende poi il pellet in 1 ml di H<sub>2</sub>O MilliQ e si trasferisce in eppendorf, si centrifuga a 14000 rpm per 5 minuti e si elimina il surnatante. Poi si procede a risospendere delicatamente il pellet in 200 µl di soluzione LiAc 0,1 M per trasformazione, per poi incubare a 30 °C in termoblocco per 15 minuti. A questo punto, si aliquotano 200 µl di soluzione in nuove eppendorf, si centrifuga a 14000 rpm per 5 minuti e si elimina il surnatante.

Ogni eppendorf corrisponde ad una trasformazione: per ogni reazione si aggiungono i seguenti reagenti, al pellet, nell'ordine indicato in Tabella 3.6:

Reagenti	Quantità
PEG 4000 50%	480 µl
LiAc 1M	72 µl
ssDNA carrier	5 µl
DNA plasmide	2 µg
dsDNA repair	24 µl
ddH <sub>2</sub> O	<i>a volume</i>

**Tabella 3.6. Reagenti e quantità per reazione di trasformazione.** *Volume finale di DNA del plasmide, DNA del riparo e H<sub>2</sub>O è pari a 70 µl.*

Si procede a vortexare le mix di reazione, per poi lasciare incubare a 30 °C in termoblocco per 30 minuti. Finita l'incubazione, si mescolano leggermente le eppendorf di reazione e si mettono ad incubare a 42 °C in termoblocco per 20 minuti. Successivamente, i campioni vengono centrifugati per 5 minuti a 14000 rpm, si elimina il surnatante e si risospende il pellet in 1 ml di terreno YPG fresco, per poi trasferire la risospensione in 5 ml di terreno ricco, in falcon da 45 ml. Il passaggio successivo consta di un'altra incubazione, a 28 °C in agitazione per circa 3 ore.

Successivamente si centrifuga a 4000 rpm per 5 minuti e si elimina il surnatante; il pellet viene risospeso in 1 ml di ddH<sub>2</sub>O (lavaggio) e trasferita la sospensione in nuove eppendorf, che vengono poi centrifugate a 14000 rpm per 5 minuti per eliminarne il surnatante. Infine, si risospende il pellet ottenuto in 120 µl di ddH<sub>2</sub>O (o di NaCl 0,9 %) e si piastra in terreno selettivo; lasciando crescere, in ultimo, a 28 °C per 2-3 giorni.

### 3.3.7 ESTRAZIONE DNA GENOMICO DA LIEVITO

Il protocollo di estrazione di DNA genomico da lievito è stato eseguito secondo il metodo di *Looke et al. (2011)*, che prevede la lisi delle cellule con una soluzione di Litio Acetato (LiAc) e SDS, con successiva precipitazione del DNA con etanolo. Il giorno precedente l'estrazione, si prepara un inoculo in 2 ml di YPG del ceppo di interesse e si lascia crescere in agitazione a 28 °C *overnight*. Il giorno successivo, come da protocollo, si centrifugano 500 µl di coltura a 14000 rpm per 5 minuti a 4 °C, si elimina il surnatante e si risospende il pellet nella soluzione di lisi precedentemente preparata (LiAc 0,2 M+SDS 1%); la risospensione viene vortexata ed incubata a 75 °C per 10 minuti. In seguito, si operano delle successive aggiunte di etanolo: si aggiungono 300 µl di etanolo 100% (v/v), che consente la precipitazione del DNA, si vortexa e centrifuga il campione per 5 minuti a 4 °C a 14000 rpm, si elimina il surnatante, e si aggiungono 150 µl di etanolo 70% (v/v); nuovamente, si vortexa e centrifuga a 14000 rpm per 5 minuti a 4 °C, per poi eliminare il surnatante. Il pellet ottenuto viene lasciato asciugare a 37 °C per 20 minuti, in modo che l'etanolo evapori completamente. Una volta seccato il campione, si aggiungono 100 µl di H<sub>2</sub>O sterile per risospenderlo. Infine, si centrifuga 14000 rpm a 4 °C per 3 minuti, per poi recuperare 80 µl di surnatante: l'eluato, che contiene il DNA genomico, viene trasferito in una nuova eppendorf.

### 3.3.7 SPORULAZIONE LIEVITI

La procedura di sporulazione su medium solido si basa sulla creazione di una condizione ostile nella crescita dei lieviti. In particolare, richiede la crescita in terreno ricco seguita dal piastramento in terreno povero di zuccheri fermentescibili (terreno K-Ac 1%): questa condizione causa il blocco della moltiplicazione cellulare e una trasformazione della cellula con ispessimento della parete, con la conseguente formazione di spore.

Il pomeriggio precedente la procedura di sporulazione, quindi, viene fatto un inoculo dei cloni di interesse in terreno ricco YPG, poi lasciato crescere *overnight* a 28 °C in agitazione. Il giorno successivo, si preleva 1 ml di coltura e si trasferisce in una eppendorf, per poi centrifugare a 14000 rpm per 3 minuti e rimuovere il surnatante. A questo punto si procede con un lavaggio in acqua MilliQ, in modo da eliminare eventuali tracce rimaste di terreno ricco YPG. Una volta risospeso il pellet, si centrifuga e si rimuove il surnatante. Quindi, si risospende il pellet in 10-20 µl di H<sub>2</sub>O, creando una sorta di composto denso, che andrà poi prelevato nell'ordine di circa 5 µl per rilasciare degli spot sul terreno di potassio acetato. La piastra viene poi lasciata a crescere alla temperatura di 28 °C per 2-3 giorni.

### 3.3.8 DISSEZIONE TETRADI

La dissezione delle tetradi è una tecnica che consente la separazione delle spore aploidi appartenenti ad una stessa tetrad, con l'ausilio di un micromanipolatore e su terreno solido, dove le spore germineranno seguendo il ciclo mitotico. Le spore racchiuse nell'asco sono i prodotti aploidi di un'unica meiosi e la separazione delle tetradi, ordinate secondo questa procedura, consente l'indagine diretta delle singole spore. Il protocollo di dissezione prevede la preparazione preliminare di strisce sottili di terreno YPG (10 ml), colate fresche per evitare che si secchino e poi passate alla fiamma con flambatore a gas. Dal terreno solido nelle piastre si ricavano dei rettangoli di approssimativamente 4,3x2,4 cm; poi si pulisce con dell'alcol l'area di lavoro sul bancone, per creare sterilità. Aiutandosi con una pinzetta, debitamente sterilizzata, si immerge un vetrino nuovo nell'etanolo e si passa velocemente alla fiamma; si ripete la procedura per un altro vetrino, che servirà per tagliare i rettangoli di terreno sui quali verranno poste le tetradi divise. A questo punto, si può posizionare la striscia di terreno sul vetrino sterilizzato, per poi dividere una *slice* di qualche millimetro e separarla leggermente, che servirà per depositare le tetradi, sospese in un film di acqua. Con un puntale sterile prelevare una punta (visibile) del clone scelto e risospendere in 90 µl di H<sub>2</sub>O; poi conservare in ghiaccio. Per procedere con la dissezione è necessario un trattamento con un enzima litico, la zimoliasi, che digerisce parzialmente la parete dell'asco in cui è contenuta la tetrad. Si aggiungono ai lieviti sospesi in acqua 2 µl di zimoliasi e si passa velocemente sulla fiamma per scaldare l'enzima, che lavora intorno a 37 °C; poi si tiene la eppendorf in ghiaccio per interrompere la reazione. Si procede immergendo un'ansa (sterilizzata sulla fiamma e raffreddata) nella eppendorf per prelevare le tetradi e si distribuiscono quindi i lieviti sulla *slice* di agar. Aiutandosi con la pinzetta, posizionare il vetrino capovolto sulla cameretta apposita, poi sistemare sul microscopio e regolare l'obiettivo a 200 ingrandimenti (20x). Le tetradi vengono a questo punto divise utilizzando un apposito microago, controllato da un micromanipolatore e dotato di viti micrometriche. Si procede al microscopio da dissezione per scegliere tetradi sufficientemente isolate, per poi prelevare con il bordo dell'ago la tetrad scelta. È necessario regolare il fuoco in modo che si visualizzi l'ago sottostante l'agar, per poi continuarne la regolazione man mano che si sposta l'ago verso la zona di agar pulita. Si continua in questo modo fino a quando non si nota l'impatto dell'ago con l'agar: una volta toccato l'agar, di tamburella delicatamente il banco di lavoro alzando ed abbassando l'ago con piccoli movimenti per rilasciare la tetrad. La procedura va ripetuta per ogni spora della tetrad, posizionandole verticalmente in fila sull'agar. Una volta terminata la dissezione, depositare la strisciolina di agar con le spore su terreno solido YPG, dopo averla scaldata velocemente sulla fiamma. Infine, si tiene la piastra in crescita per 2-3 giorni a 28 °C.

### 3.3.9 DETERMINAZIONE MATING TYPE

Il protocollo di determinazione del tipo sessuale di lievito (*mating type*) è stato eseguito secondo il metodo di *Arras et al. (2020)*, che prevede l'incubazione *overnight* a 28 °C dei ceppi di cui si deve determinare il *mating type*, nonché dei ceppi *tester* (dei quali il tipo *a* o  $\alpha$  è conosciuto), in 2 ml di terreno liquido YPGA. Il giorno successivo viene misurata la densità ottica degli inoculi, che poi vengono diluiti in YPGA liquido a OD<sub>600nm</sub> pari a 0,2. Una volta portati i ceppi alla corretta densità, si procederà ad incrociare ogni campione con i ceppi *tester a* o  $\alpha$ , così come ad effettuare gli opportuni controlli sperimentali (ceppo *tester a*+ $\alpha$ ; *a*+ $\alpha$ ;  $\alpha$ + $\alpha$ ; *a*+2n;  $\alpha$ +2n; 2n+2n); in ogni eppendorf dovrà essere presente un volume di 250  $\mu$ l per ceppo. I campioni, così incrociati, vengono lasciati in incubazione a 28 °C per approssimativamente 5 ore, dopo le quali i risultati sono già visibili.

### 3.3.10 IBRIDAZIONE

I ceppi aploidi da usare per l'incrocio, dei quali è stato reso noto il tipo sessuale, vengono inoculati, così come i parentali di controllo, in 2 ml di terreno ricco liquido YPG e lasciati crescere a 28 °C *overnight*. Il giorno successivo viene misurato l'OD<sub>600nm</sub> degli inoculi al fine di portare tutti i cloni alla stessa densità ottica (OD<sub>600nm</sub>=1) ed avere quindi una densità cellulare comparabile per la fase di incrocio vera e propria. Una volta ottenuta la diluizione degli inoculi in terreno ricco YPG, si procede all'incrocio: in eppendorf sterili si uniscono i ceppi aploidi di *mating type* opposto (*a*+ $\alpha$ ), ponendo 50  $\mu$ l di un aploide (*a* o  $\alpha$ ) con 50  $\mu$ l di un altro aploide ( $\alpha$  o *a*) dell'altro ceppo, ottenendo quindi un volume totale di 100  $\mu$ l. Successivamente, si lasciano crescere i ceppi così incrociati per circa 3-6 ore: dopo le prime 3 ore, al termine delle quali è già possibile vedere gli effetti dell'incrocio, si procede a depositare su piastra doppia selettiva (YPG+HYGRO+NAT) gocce di 5  $\mu$ l dell'incrocio. I ceppi incrociati in eppendorf si lasciano poi incubare ulteriormente a 28 °C per approssimativamente altre 3 ore, per poi ripetere le procedura degli *spot* da 5  $\mu$ l, sempre ponendoli su piastra doppia selettiva. Oltre ai ceppi aploidi incrociati, è opportuno preparare ed incrociare allo stesso modo dei ceppi di controllo, positivo e negativo. La piastra con gli *spot* degli ibridi viene poi lasciata in incubazione a 28 °C per 2-3 giorni.

### 3.4 SAGGI DI MICROFERMENTAZIONE

#### 3.4.1 CONTA CELLULARE CON CAMERA DI BURKER

Per la valutazione dei ceppi in Azienda sono state allestite delle prove di fermentazione che prevedessero l'inoculo di cellule nella concentrazione definita di  $3 \cdot 10^6 \text{ cell/ml}$ , in 175 ml di mosto. Il corretto numero di cellule da inoculare è stato determinato con la camera di Burker utilizzando il colorante blu di metilene, che permette di distinguere le cellule vive (bianche) da quelle morte (blu). Tale metodo di conta si avvale di un particolare vetrino profondo 0,1 mm, la camera di Burker, che presenta 9 quadranti di 1 mm, ognuno diviso in 16 quadrati di 0,2x0,2 mm divisi da una doppia linea, per una superficie di  $1/25 \text{ mm}^2$ . Il campione, dopo essere stato diluito nell'ordine di 1:10 o 1:100 ed addizionato di una goccia di blu di metilene, viene fatto defluire per capillarità all'interno della camera, sotto ad un vetrino coprioggetto. La conta viene quindi eseguita, avvalendosi di un microscopio con obiettivo 40x, scegliendo arbitrariamente 10 quadranti. Il numero di cellule per ml deve essere poi calcolato applicando la seguente formula:

$$\text{cell/ml} = \left( \frac{\text{media cell. contate}}{4} \right) \cdot 10^6 \cdot \text{fattore di diluizione}$$

Il rapporto percentuale tra il numero di cellule vive e cellule totali permette di calcolare l'indice di vitalità.

#### 3.4.2 PROVE DI FERMENTAZIONE

Le prove di fermentazione sono state condotte utilizzando il sistema *ANKOM<sup>RF</sup> Gas Production System*, che utilizza bottiglie chiuse con specifici tappi (moduli RF1, Figura 3.2), provvisti di sensori in grado di rilevare, a intervalli regolari di 30 minuti, la pressione (in bar) sviluppatasi all'interno della bottiglia stessa, dovuta alla produzione di CO<sub>2</sub> durante la fermentazione. I dati, registrati in tempo reale, permettono di monitorare in modo automatizzato la cinetica di fermentazione durante la prova; inoltre il sistema è dotato di un *software*, al quale vengono trasmessi i dati.



**Figura 3.2. Bottiglie usate per i saggi fermentativi.** Le prove di fermentazione sono state realizzate in 175 ml di mosto in bottiglie collegate al sistema ANKOM<sup>RF</sup>, provviste di tappi in grado di rilevare la pressione.

Gli inoculi vengono ottenuti preinoculando le colonie in 30 ml di terreno ricco YPD 40%, con crescita *overnight* in agitazione a 28 °C. Prima di inoculare il mosto vengono determinate le concentrazioni dei preinoculi mediante conta cellulare con camera di Burkler; una volta calcolate le cellule per ml, sapendo che le fermentazioni in bottiglia richiedono 175 ml di mosto l'una e volendo inoculare 3 milioni di cellule per ml, si procede a calcolare il volume corretto di preinoculo, utilizzando la seguente formula:

$$3 \cdot 10^6 \text{ cell.} \cdot x \text{ ml} \cdot 175 \text{ ml} = 525 \cdot 10^6 \text{ cell.} \cdot x \text{ bottiglia}$$

$$525 \cdot 10^6 / n^\circ \text{ cell} \cdot x \text{ ml} = \text{volume di inoculo per bottiglia}$$

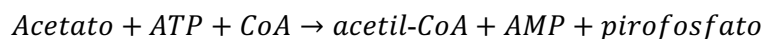
Infine, le bottiglie contenenti il mosto inoculato con la corretta concentrazione di cellule vengono chiuse con i tappi provvisti di sensore e poste in incubatore a 20 °C per approssimativamente 136 ore. Il sistema ANKOM<sup>RF</sup> registra quindi la pressione del gas generatosi dalla fermentazione ogni 30 minuti, fino a quando l'aumento di pressione non viene più rilevato e la prova può quindi considerarsi finita. L'aumento di pressione viene utilizzato per determinare in modo indiretto la percentuale di etanolo presente nel mosto, secondo l'equazione della retta  $y = 5,2173x - 0,1442$ ; dove in ordinata è presente il valore di pressione cumulata raggiunto. Tale retta, derivante dai dati ottenuti da un *pool* di più di trecento esperimenti svolti in Azienda, pone in relazione pressione e etanolo con un coefficiente di correlazione  $R^2 = 0,9875$ . Al termine dell'esperimento, le bottiglie vengono smontate, i dati registrati salvati ed il mosto fermentato conservato per successive analisi.

### 3.4.3 DETERMINAZIONE TITOLO ALCOLIMETRICO

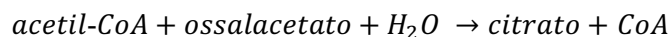
La determinazione del titolo alcolimetrico consiste nella misura del contenuto di etanolo, che viene espresso in percentuale di volume presente nella bevanda alcolica. Per l'analisi si preleva un campione di 30 ml di mosto fermentato, che viene centrifugato a 4000 rpm per 5 minuti per poi utilizzarne il surnatante per la misurazione. L'analisi viene effettuata tramite lo strumento *Alcolyzer Wine M (Anton Paar)*, che determina il contenuto di etanolo mediante spettroscopia del vicino infrarosso (NIR).

### 3.4.4 DETERMINAZIONE ACIDO ACETICO

La determinazione dell'acido acetico è stata eseguita con il kit enzimatico *K-ACET Megazyme* (Bray, Ireland), secondo la reazione di seguito descritta. L'acido acetico viene convertito in una prima reazione ad acetil-CoA da parte dell'acetil-CoA-sintetasi, secondo la reazione:



Successivamente, la citrato sintasi, in presenza di acetil-Co-A, converte l'ossalacetato in citrato:



L'ossalacetato, richiesto nella seconda reazione, viene formato a partire da L-malato-deidrogenasi e  $\text{NAD}^+$  in presenza di L-malato deidrogenasi; in questa reazione  $\text{NAD}^+$  viene ridotto a NADH.



Poiché non c'è proporzionalità lineare tra la differenza di assorbanza misurata e la concentrazione di acido acetico, è necessario calcolare la differenza di assorbanza ( $\Delta$  assorbanza) avvalendosi della formula seguente:

$$\Delta A_{\text{acido acetico}} = \left[ (A_2 - A_0)_{\text{campione}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{campione}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{campione}}} \right] - \left[ (A_2 - A_0)_{\text{bianco}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{bianco}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{bianco}}} \right]$$

Successivamente, la concentrazione di acido acetico viene calcolata con l'equazione di seguito riportata:

$$C = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v}$$



dove,

$V$  = volume finale [ml]

$MW$  = peso molecolare dell'acido acetico [g/mol]

$\varepsilon$  = coefficiente di estinzione molare di NADH a 340 nm=6300

$d$  = percorso ottico [cm]

$v$  = volume campione [ml]

La quantità di acido acetico presente nella cuvetta deve essere compresa tra 0,3 e 20  $\mu\text{g}$ ; per questo motivo il campione di mosto, prima di essere utilizzato, andrà diluito di un fattore 1:10. La procedura viene svolta come riportato in Tabella 3.7.

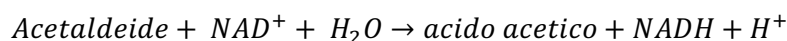
Reagenti	<i>bianco</i>	<b>campione</b>
<b>H<sub>2</sub>O distillata</b>	2,10 ml	2,00 ml
<b>campione (10<sup>-1</sup>)</b>	-	100 $\mu\text{l}$
<b>Soluzione 1 (<i>buffer</i>)</b>	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
<b>Soluzione 2 (NAD<sup>+</sup>/ATP/PVP/CoA)</b>	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
*mescolare pipettando per miscelare i reagenti e leggere l'assorbanza della soluzione ( $A_0$ ) dopo approssimativamente 3 minuti; poi proseguire la reazione aggiungendo:		
<b>Sospensione 3 (L-MDH/CS)</b>	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
*mescolare pipettando per miscelare i reagenti e leggere l'assorbanza della soluzione ( $A_1$ ) dopo approssimativamente 4 minuti; poi proseguire la reazione aggiungendo:		
<b>Sospensione 4 (ACS)</b>	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
*mescolare pipettando per miscelare i reagenti e leggere l'assorbanza della soluzione ( $A_2$ ) alla fine della reazione dopo circa 12-16 minuti. Se la reazione non è terminata dopo 12 minuti, proseguire la lettura dell'assorbanza ad intervalli di 4 minuti fino ad un massimo di 20.		

**Tabella 3.7. Procedura di determinazione dell'acido acetico, reagenti e quantità per reazione in cuvetta.**

Le letture vengono eseguite con spettrofotometro (*UV-Vis Spectrophotometer Jasc V-530*) e la concentrazione di acido acetico restituita in g/l, attraverso il sistema di calcolo messo a punto nel programma *Mega-Calc*<sup>TM</sup>.

### 3.4.5 DETERMINAZIONE ACETALDEIDE

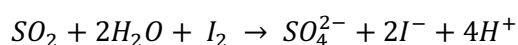
Il contenuto di acetaldeide dei campioni è stato determinato utilizzando il kit enzimatico *K-ACHYD Megazyme* (Bray, Ireland). La reazione, di seguito riportata, si basa sull'ossidazione dell'acetaldeide ad acido acetico, in presenza di aldeide deidrogenasi e  $NAD^+$ .



Il NADH che si forma in questa reazione, misurato come aumento dell'assorbanza a 340 nm, risulta essere proporzionale alla quantità di acetaldeide presente nel campione. L'analisi viene effettuata tramite spettrofotometro (*UV-Vis Spectrophotometer Jasc V-530*) ed il contenuto di acetaldeide calcolato grazie al programma *Mega-Calc*<sup>TM</sup>.

### 3.4.6 DETERMINAZIONE ANIDRIDE SOLFOROSA

La determinazione del contenuto di anidride solforosa di un campione di mosto (o vino) si effettua tramite titolazione iodometrica dell'anidride solforosa libera e totale in ambiente acido; l'anidride solforosa totale è la somma tra anidride solforosa libera e combinata: l'anidride libera è presente nel mosto allo stato di gas o in combinazioni inorganiche:  $H_2SO_3$  per la frazione indissociata,  $HSO_3^-$  (ione disolfuro) e  $SO_3^{2-}$  (ione solfito); l'anidride combinata è invece legata a composti di natura aldeidica. L'analisi viene svolta da un titolatore automatico (*Steroglass FLASH Titrator*, con *AS24 Autosampler* ed un elettrodo *Platinum Redox -Accsen EL450C*), e si basa sul metodo *Ripper-Schmitt*, tra i più utilizzati per precisione e affidabilità, nel quale viene eseguita una titolazione iodometrica, in cui si ha lo iodio che reagisce con l'anidride solforosa secondo la reazione:



Lo strumento rende l'ambiente acido per la successiva titolazione, con aggiunta di  $I_2$  [0,005 M], addizionando automaticamente al campione  $H_2SO_4$  [3,6 M]; l'anidride solforosa libera viene determinata dalla titolazione con lo iodio. In seguito, viene aggiunta automaticamente NaOH [4 M] per liberare l'anidride solforosa combinata; dopo 5 minuti lo strumento aggiunge  $H_2SO_4$  per riportare il pH del campione ad acido ed eseguire poi una seconda titolazione, addizionando iodio. Infine, come accennato, l'anidride solforosa totale viene calcolata come somma delle forme libera e combinata. Il risultato è fornito in ppm (mg/l).

### 3.4.7 DETERMINAZIONE CONTENUTO DI ACIDI ORGANICI E ZUCCHERI

Il contenuto di acidi organici e zuccheri dei campioni di mosto fermentato è stato determinato utilizzando la tecnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), un tipo di cromatografia liquida che consente di separare due o più composti presenti nel campione, servendosi delle diverse affinità per una fase stazionaria ed una mobile. La fase stazionaria è posta all'interno di una colonna cromatografica, mentre la fase mobile fluisce attraverso essa: le sostanze più affini alla fase stazionaria impiegheranno un tempo maggiore per percorrere la colonna, rispetto a sostanze a bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per quella mobile, che saranno quindi più rapide. Il campione viene iniettato e spinto nella colonna dalla fase mobile attraverso la fase stazionaria; al termine della colonna sono presenti rilevatori (IR a spettroscopia infrarossa e UV-210 nm, ultravioletta) ed un calcolatore, che permettono l'analisi in continuo delle sostanze presenti nel campione, restituite in un cromatogramma.

Prima di essere caricati, i campioni sono stati preparati per eliminare impurità che potrebbero interferire con le letture nella fase di misurazione. Dopo aver centrifugato i campioni a 4000 rpm per 5 minuti, si provvede a diluire il surnatante (1:2) con acqua MilliQ; la diluizione viene poi filtrata (filtro 0,2 µm) ed analizzati 20 µl in HPLC *Agilent 1200 Series* con colonna *BIORAD Aminex HPX-87H* (300x7,8 mm) a 65 °C. La fase mobile utilizzata dallo strumento è H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [0,005 M], mentre i detector sono VWD (*Variable Wavelength Detector*; λ=210 nm) e RID (*Refractive Index Detector*; 35 °C). I risultati, resi come cromatogramma, sono stati analizzati allo scopo di identificare e quantificare le molecole di interesse presenti presso il laboratorio chimico dell'Azienda partner (Italiana Biotecnologie S.r.l).

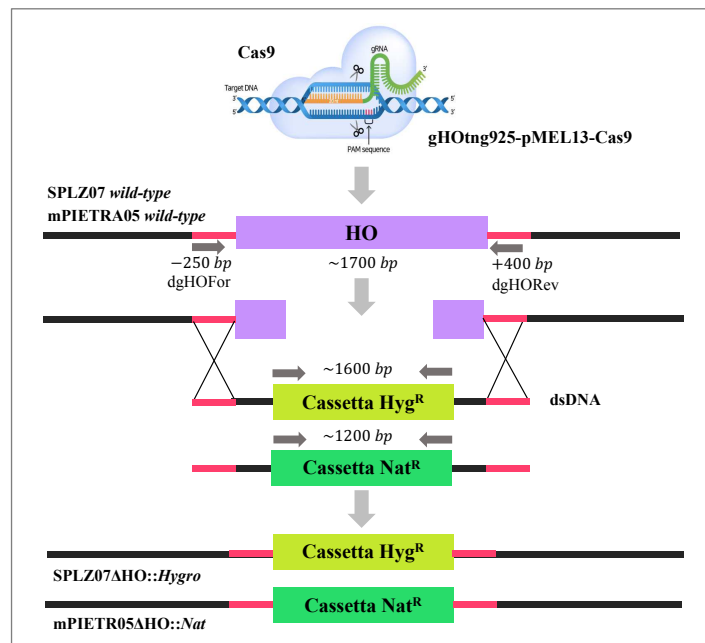
### 3.4.8 ANALISI PROFILO AROMATICO

La determinazione dei componenti volatili del vino è stata eseguita con la tecnica analitica di *Gas Chromatography – Mass Spectrometry* (GS-MS), che abbina la gascromatografia alla spettrometria di massa, consentendo di identificare e quantificare analiti presenti in concentrazioni ridotte all'interno di matrici complesse. Gli strumenti funzionano in combinazione: mentre il gascromatografo separa i composti presenti nel campione, lo spettrometro di massa funziona da rilevatore. Per effettuare l'analisi, è necessaria una fase preparatoria di estrazione in fase solida (*SPE Cartridges Macherey-Nagel CHROMABOND Easy 3ml/200 mg*); in seguito, è stato utilizzato il sistema *GC Perkin Elmer Clarus 580* con il rilevatore *MS detector Perkin Elmer SQ8S*, che ha permesso di separare i campioni sfruttando il differente tempo di ritenzione nella fase stazionaria della colonna capillare di cui è dotato lo strumento (*Perkin-Elmer WAX-ETR* (30 m x 0,32 mm ID x

0,25  $\mu\text{m}$ ). I campioni, in particolare, dopo la fase preparatoria vengono vaporizzati e gli analiti fatti correre grazie ad un gas inerte (elio 1,5 ml/min), nella colonna capillare, dove vengono separati in base al differente tempo di ritenzione. Una volta separate, le molecole vengono frammentate da una sorgente di elettroni, per poi essere separate sulla base del rapporto massa/carica; infine, gli ioni vengono analizzati e comparati con degli standard. La rampa di temperatura del gascromatografo è 40 °C per 1 min, per salire poi di 5 °C al minuto fino ad arrivare a 240 °C, mantenuti poi per 5 min. 1  $\mu\text{l}$  di campione viene iniettato nello strumento tramite auto campionatore; l'iniettore (*SPLIT/SPLITLESS*) è impostato ad una temperatura di 250 °C e 20 ml/min.

## 4. RISULTATI

Lo scopo finale di questa Tesi è consistito nel tentativo di attenuare uno specifico carattere negativo del lievito enologico mPIETRA05, ovvero la produzione piuttosto elevata di acido acetico, attraverso l'incrocio con il ceppo SPLZ07, selezionato tra quelli della collezione dell'Azienda partner del progetto (Italiana Biotecnologie). Rispetto alle tecniche normalmente utilizzate, l'ibridazione è stata qui effettuata mediante una procedura basata sull'ingegneria genetica, in grado di ridurre notevolmente il tempo necessario a generare gli ibridi da ceppi di lievito omotallici. Come descritto nell'Introduzione, l'omotallismo del lievito rappresenta una problematica per le procedure di ibridazione tradizionali a causa della difficoltà di isolare le cellule allo stato aploide, ottenute dalla sporulazione, prima che avvenga la conversione del *mating type* e la coniugazione, rigenerando lo stato diploide. Poiché il gene *HO* è il solo responsabile del carattere omotallico, lo schema sperimentale di questa Tesi ha previsto la modificazione del gene *HO* con il sistema CRISPR-Cas9 (Figura 4.1). Il gene è stato inattivato mediante la sua sostituzione con un marcatore dominante (i.e., antibiotico-resistenza), ottenendo così la conversione dei ceppi dallo stato omotallico a quello eterotallico. Da essi, sono stati isolati svariati ceppi aploidi, facilmente incrociabili tra loro, che hanno consentito di generare diversi ibridi, sui quali sono state successivamente eseguite le analisi tecnologiche nei laboratori dell'Azienda, in modo da valutarne le caratteristiche fermentative e metaboliche.

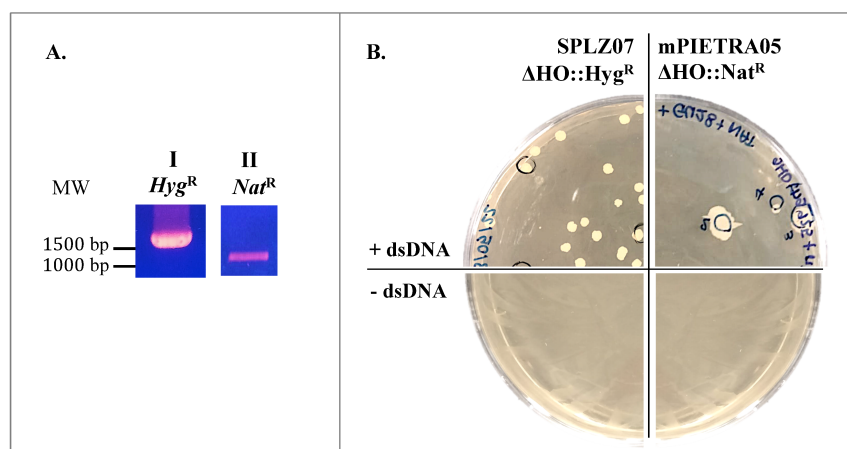


**Figura 4.1.** Rappresentazione schematica della trasformazione dei ceppi di lievito SPLZ07 e mPIETRA05. Mediante sistema CRISPR-Cas9, è stata effettuata la modificazione genetica di due diversi ceppi di lievito, consistente nella sostituzione del gene *HO* con il dsDNA marcatore per la resistenza *Hyg<sup>R</sup>* (SPLZ07) e *Nat<sup>R</sup>* (mPIETRA05).

#### 4.1 MODIFICAZIONE GENETICA DEI LIEVITI: CONVERSIONE DEI CEPPI DA OMOTALLICI A ETEROTALLICI

La trasformazione dei lieviti è stata eseguita utilizzando il plasmide gHOTng925-pMEL13-Cas9, già disponibile in Laboratorio, in grado di esprimere nelle cellule di lievito la nucleasi Cas9 e la molecola di gRNA indirizzata verso il gene *HO*, nonché la resistenza ad uno specifico antibiotico (G418, geneticina). Inoltre, nelle trasformazioni dei ceppi è stato aggiunto il dsDNA di riparo, necessario per sostituire il gene *HO* nei ceppi SPLZ07 e mPIETRA05, rispettivamente con il marcatore per la resistenza ad igromicina (*HygR*) e alla nurseotricina (*NatR*). I due frammenti di dsDNA sono stati ottenuti mediante reazioni di amplificazione con PCR, utilizzando i primer specifici riportati in Metodi. Successivamente, i prodotti di PCR sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio, allo scopo di verificare che le dimensioni corrispondessero a quelle attese (*HygR*: 1600 bp, *NatR*: 1200 bp), come si può osservare in Figura 4.2.

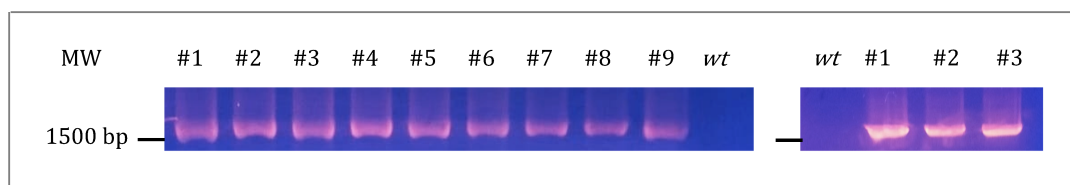
La trasformazione dei lieviti è stata eseguita come riportato in Metodi, co-trasformando cellule di lievito SPLZ07 con il plasmide gHOTng925-pMEL13-Cas9 ed il dsDNA *HygR* e cellule di lievito mPIETRA05 con lo stesso plasmide ed il dsDNA *NatR*. I risultati ottenuti dalle trasformazioni sono visibili in Figura 4.2 (pannello B): si può osservare che nelle piastre co-trasformate con il dsDNA di riparo, sia nel caso di *HygR* che di *NatR*, sono cresciute diverse colonie indipendenti, del tutto assenti nella reazione di trasformazione con il solo plasmide guida gHOTng925-pMEL13-Cas9. Il basso numero di trasformanti osservati per il ceppo mPIETRA05 potrebbe essere stato determinato da una minore trasformabilità del ceppo, oppure da una ridotta quantità di DNA disponibile nella trasformazione, sebbene possa anche riflettere una differente stringenza dell'antibiotico.



**Figura 4.2. Modificazione dei ceppi SPLZ07 e mPIETRA05 parentali.** (A) Analisi elettroforetica in gel di agarosio (1%) dei prodotti di PCR per i dsDNA del marcatore *HygR* (1600 bp) (I) e *NatR* (1200 bp) (II), visualizzati con UV dopo colorazione con etidio bromuro. (B) Co-trasformazione dei lieviti SPLZ07 e

*mPIETRA05* con il plasmide guida (*gHOtng925-pMEL13-Cas9*), in assenza (-) o in presenza (+) di *dsDNA HygR (SPLZ07)* o *NatR (mPIETRA05)*.

Alcune colonie indipendenti ottenute dalla trasformazione sono state quindi sottoposte ad una verifica della modificazione introdotta. Innanzitutto, è stato osservato che i diversi cloni erano effettivamente capaci di crescere in terreno contenente l'antibiotico igromicina, dimostrando di aver integrato il marcatore *HygR*. Inoltre, mediante PCR locus-specifiche, sono state effettuate su *SPLZ07* le verifiche molecolari dell'inserzione del marcatore *HygR*, allestendo due diverse PCR con primer specifici per il solo marcatore, o per il marcatore ed il locus *HO*, come riportato in Metodi. I prodotti ottenuti dalle reazioni sono poi stati visualizzati, in seguito a separazione elettroforetica su gel e colorazione con etidio bromuro, risultando in frammenti delle dimensioni attese (Figura 4.3), con la dimostrazione che il gene *HO* era stato correttamente sostituito dal DNA marcatore *HygR*.

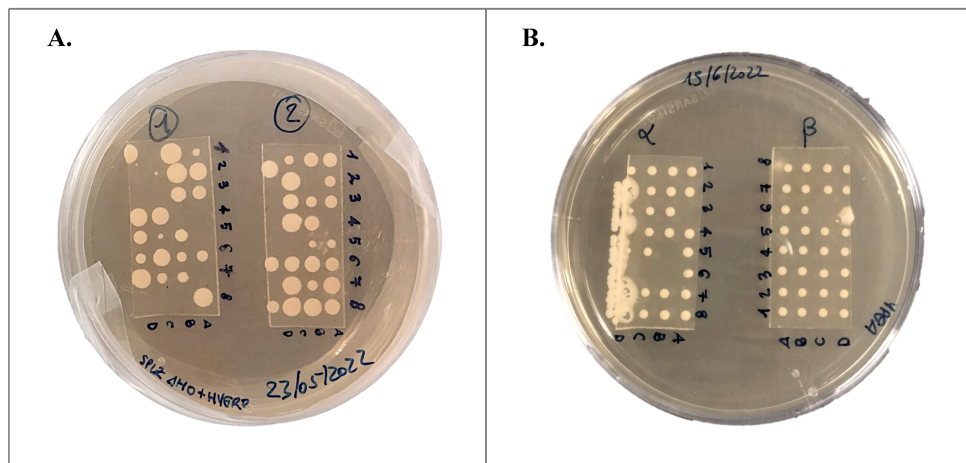


**Figura 4.3. Verifica molecolare mediante PCR specifica.** *Analisi elettroforetica in gel di agarosio (1%) dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione di HygR nei cloni #1-9 con primer marcatore-specifici (HygR-For, HygR-Rev) (pannello a sinistra), o con primer marcatore- e locus-specifici (HygR-For, dgHO-Rev) per i cloni #1-3 (pannello a destra). In entrambe le PCR, nel ceppo parentale SPLZ07 non è stato ottenuto prodotto di amplificazione, come atteso.*

Allo stesso modo, è stata condotta l'analisi dei cloni ottenuti per il ceppo *mPIETRA05*, sia osservando che essi erano in grado di crescere in terreno con l'antibiotico nurseotricina, e quindi di aver integrato il marcatore *NatR*, sia allestendo reazioni di amplificazione con gli specifici primer nelle condizioni descritte in Metodi. Tuttavia, per queste ultime analisi, nessuna combinazione di primer ha permesso di ottenere la prodotti di amplificazione con la PCR, neppure utilizzando opportuni controlli positivi, suggerendo perciò che le sequenze degli oligonucleotidi, funzionanti in *SPLZ07*, potrebbero invece non appaiarsi efficacemente nel genoma di un ceppo diverso, come *mPIETRA05*. Ciononostante, sono state condotte per entrambi i ceppi le ulteriori analisi, al fine di verificare che la delezione del gene *HO* fosse effettivamente avvenuta, generando ceppi eterotallici dai lieviti parentali omotallici.

## 4.2 SPORULAZIONE E ISOLAMENTO DEI CEPPI APLOIDI

Per generare i ceppi aploidi, è stata dapprima indotta la sporulazione dei lieviti incubandoli per diversi giorni in uno specifico terreno solido (K-Ac), come descritto nei Metodi. Diversi cloni di SPLZ07 (HygR) e mPIETRA05 (NatR) sono stati fatti quindi sporulare e successivamente è stata eseguita la dissezione delle tetradi, nella quale le singole spore di ogni tetrade sono state separate meccanicamente con l'uso di uno specifico micromanipolatore, e deposte in modo ordinato su terreno solido ricco come descritto nei Metodi. In particolare, per il ceppo SPLZ07 (HygR) sono stati scelti 3 cloni ricombinanti (clone #1-3), da ciascuno dei quali sono state separate ed ordinate un totale di otto diverse tetradi, poi lasciate crescere ottenendo i risultati mostrati in Figura 4.4 (pannello A). Per il ceppo mPIETRA05 (NatR), sono stati selezionati 2 cloni (clone #1-2), sui cui è stata eseguita la dissezione delle 16 tetradi (otto per ciascun clone, il cui risultato è visibile in Figura 4.4 (pannello B).



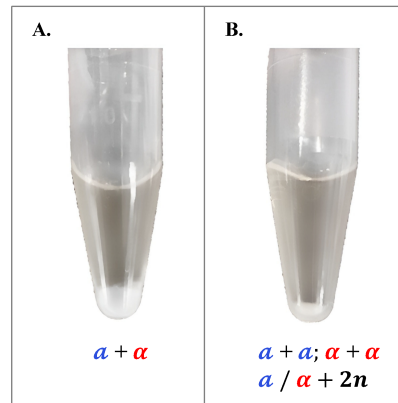
**Figura 4.4. Piastre di dissezione dei ceppi SPLZ07 e mPIETRA05- $\Delta$ HO.** Dopo la sporulazione dei ceppi modificati SPLZ07 $\Delta$ HO::*HygR* e mPIETRA05( $\Delta$ HO)::*NatR* (cloni #1-2), un totale di 8 tetradi per ciascun ceppo è stato sottoposto a dissezione meccanica, separando le singole spore di ciascuna tetrade e depositandole ordinatamente su terreno ricco per la germinazione. Dopo 2 giorni di incubazione a 28°C, è stata osservata la crescita delle colonie per i ceppi SPLZ07 (pannello A) e mPIETRA05 (pannello B).

## 4.3 DETERMINAZIONE MATING TYPE

La determinazione del tipo sessuale (*mating type*) dei ceppi modificati (MAT $\alpha$  o MAT $\alpha$ ) è stata eseguita secondo il protocollo descritto in Metodi. In particolare, per il ceppo SPLZ07 (HygR) sono state selezionate 19 spore (5 del clone #1, 5 del #2, 9 del #3). Le spore aploidi sono state scelte sulla base della morfologia e della crescita germinativa, preferendo le colonie di dimensioni maggiori e cresciute in modo omogeneo. Per il ceppo mPIETRA05 (NatR), sono state selezionate, con lo stesso criterio, le 32 spore provenienti dalle tetradi complete dei cloni #1 e #2. Dopo aver incrociato i diversi ceppi aploidi con ciascuno dei due ceppi aploidi tester, i.e., di *mating type* noto, i lieviti sono stati

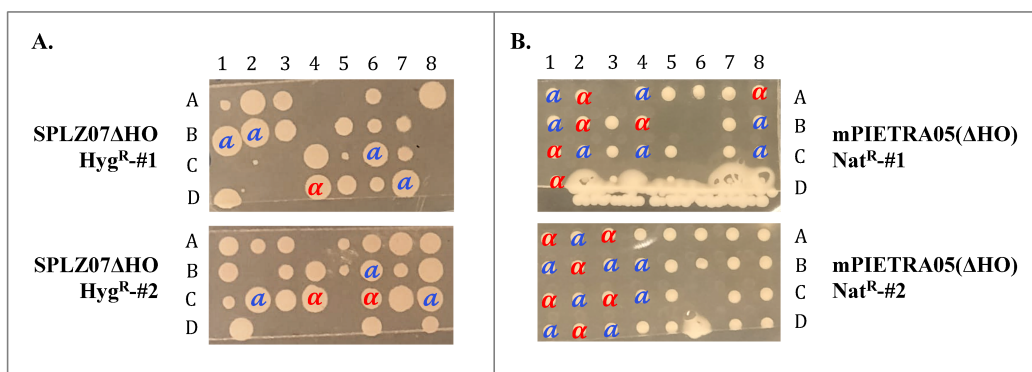


lasciati in incubazione per permettere alla coniugazione di completarsi. Il tipico risultato di un incrocio tra due aploidi di tipo sessuale diverso è visibile in Figura 4.5: durante la coniugazione le cellule evidenziano un cambiamento morfologico chiaramente visibile all'interno della provetta, con lo sviluppo di strutture filamentose che permettono di distinguere con immediatezza gli incroci avvenuti fruttuosamente da quelli non riusciti.



**Figura 4.5. Determinazione *mating type*.** Immagine rappresentativa del risultato di un test di incrocio tra ceppi di lievito eseguito in provetta in terreno ricco liquido: coniugazione avvenuta tra lieviti di *mating type* opposto  $a + \alpha$  (A); incrocio tra spore dello stesso *mating type*, o tra aploide e diploide, non avvenuto (B).

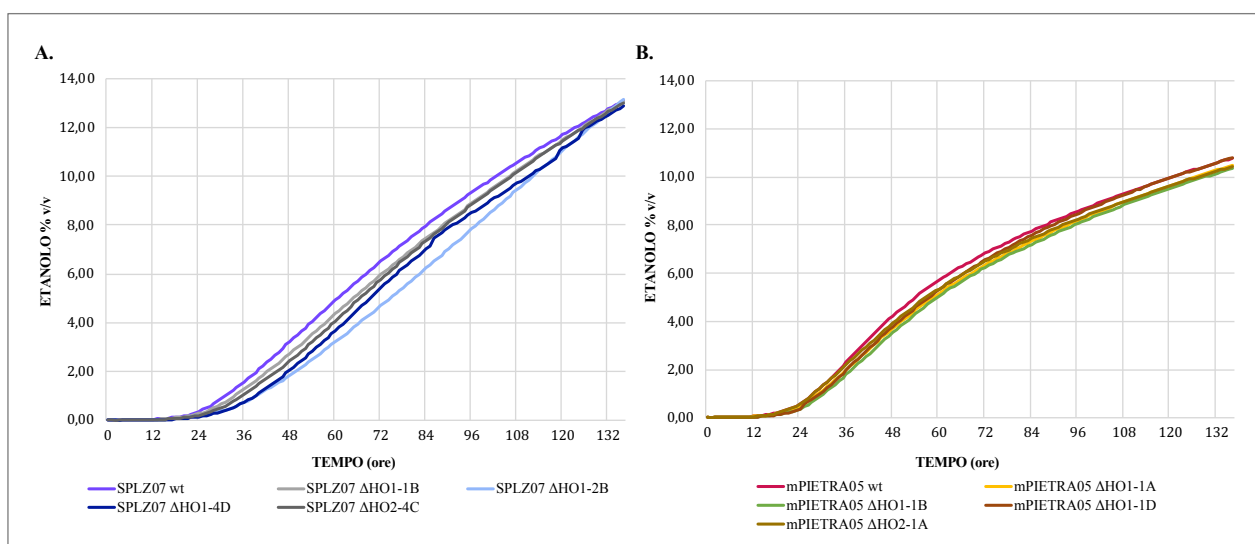
In Figura 4.6 sono schematizzati i risultati del *mating type* di alcune delle spore testate. È importante notare che tutte le spore derivate dai ceppi diploidi hanno effettivamente prodotto incroci (con un tester o l'altro), dimostrando così di essere lieviti stabilmente nello stato aploide e derivanti da diploidi effettivamente eterotallici. Tali evidenze hanno quindi suggerito che il fallimento dei controlli molecolari sul ceppo mPIETRA05, precedentemente riscontrati, fossero esclusivamente dovuti a problematiche di tipo sperimentale.



**Figura 4.6. Risultati delle prove di incrocio delle spore aploidi con ceppo *tester* W303 (MAT  $a$  e  $\alpha$ ).** A) Determinazione del *mating type* per gli aploidi del ceppo SPLZ07, indicato sul clone spora corrispondente e differenziato per colore. B) Determinazione del *mating type* delle spore analizzate per il ceppo mPIETRA05. In entrambi i casi, sono state esaminate 8 tetradi (colonne 1-8) dei cloni #1 e #2. Le spore sono state identificate dalla lettera della riga (A; B; C; D) e dal numero della colonna.

#### 4.4 PROVE DI FERMENTAZIONE APLOIDI

Una volta generati, i lieviti aploidi di entrambi i ceppi sono stati analizzati per le loro proprietà tecnologiche, con il duplice scopo di escludere un effetto (indesiderato) della modificazione genetica, ma anche di determinare che le prestazioni dei ceppi aploidi fossero consistenti con quelle dei rispettivi lieviti parentali. In particolare, sono state allestite 4 prove indipendenti di fermentazione su mosto d'uva Pignoletto, eseguite comparando ciascuno dei due lieviti parentali con 4 ceppi aploidi (2 MAT $\alpha$  e 2 MAT $\alpha$ ), selezionati tra quelli ottenuti, come esposto più dettagliatamente nei Metodi. Una volta terminate le fermentazioni, i dati sono stati analizzati per generare i grafici visibili in Figura 4.7 (pannello A e B), che rappresentano la produzione di etanolo nel tempo, descrivendo così la cinetica dell'intero processo fermentativo. Complessivamente, i risultati hanno dimostrato che gli aploidi di entrambi i ceppi SPLZ07 e mPIETRA05 presentavano un comportamento paragonabile a quello del lievito parentale, considerato come riferimento.



**Figura 4.7. Cinetiche fermentative dei lieviti.** I ceppi parentali SPLZ07 (A) e mPIETRA05 wild-type (B) ed i rispettivi ceppi aploidi sono stati monitorati durante le fermentazioni in mosto Pignoletto, misurando la quantità di alcol (etanolo % v/v) prodotta nel tempo. Le curve sono state ottenute analizzando i dati provenienti da quattro esperimenti indipendenti e riportano la media dei valori registrati. Le barre di errore non sono state riportate per permettere una maggiore chiarezza grafica delle curve.

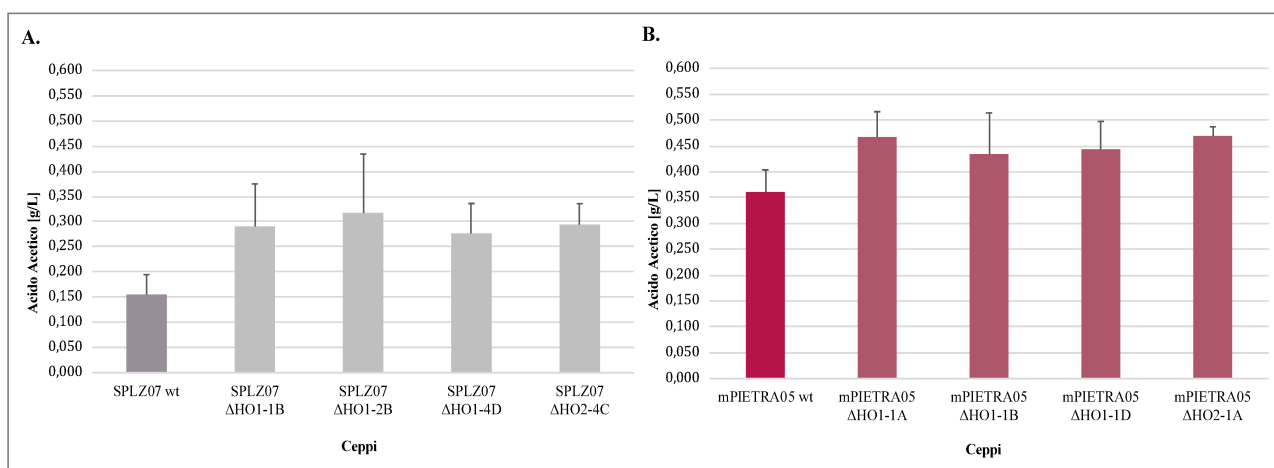
L'etanolo prodotto alla fine della fermentazione ha infatti raggiunto livelli paragonabili nell'ambito dello stesso ceppo, confermando perciò che la delezione del gene *HO* e l'inserzione del marcatore HygR o NatR non hanno determinato effetti apprezzabili sulle attitudini fermentative dei lieviti. La percentuale di etanolo prodotto (EtOH % v/v) misurata nei campioni ottenuti dai ceppi parentali e da quelli aploidi, riportata nella seguente Tabella 4.1, ha inoltre evidenziato un maggiore potere

alcoligeno per i ceppi SPLZ07, capaci di produrre livelli di etanolo leggermente più alti di mPIETRA05 (circa 13 % e 11 % v/v).

Ceppi	EtOH % (v/v)	Ceppi	EtOH % (v/v)
SPLZ07 <i>wild-type</i>	13,10 ± 0,19	mPIETRA05 <i>wild-type</i>	10,78 ± 0,44
SPLZ07ΔHO::Hygro <sup>R</sup> -#1-1B	13,07 ± 0,21	mPIETRA05(ΔHO)::Nat <sup>R</sup> -#1-1A	10,49 ± 0,54
SPLZ07ΔHO::Hygro <sup>R</sup> -#1-2B	13,15 ± 0,25	mPIETRA05(ΔHO)::Nat <sup>R</sup> -#1-1B	10,36 ± 0,59
SPLZ07ΔHO::Hygro <sup>R</sup> -#1-4D	12,89 ± 0,35	mPIETRA05(ΔHO)::Nat <sup>R</sup> -#1-1D	10,80 ± 0,43
SPLZ07ΔHO::Hygro <sup>R</sup> -#2-4C	13,00 ± 0,25	mPIETRA05(ΔHO)::Nat <sup>R</sup> -#2-1A	10,43 ± 0,74

**Tabella 4.1. Valori di etanolo (% v/v) prodotti in mosto naturale Pignoletto a fine fermentazione.** I dati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti (± SD); nel riquadro superiore sono riportati i valori per i ceppi SPLZ07; nel riquadro inferiore, sono indicati i valori per i ceppi mPIETRA05.

In seguito alle prove fermentative, sui campioni ottenuti dalle fermentazioni degli aploidi e dei rispettivi parentali, è stata eseguita l'analisi quantitativa dell'acido acetico, principale carattere fenotipico oggetto della Tesi, come descritto nei Metodi. Anche in questo caso, è stata valutata la quantità prodotta dagli aploidi rispetto ai ceppi parentali, per determinare la loro similarità rispetto a tale caratteristica fenotipica. La concentrazione di acido acetico è stata misurata in tutti i campioni di fermentazione dei ceppi SPLZ07 e mPIETRA05, ed i risultati complessivi sono riportati nella Figura 4.8.

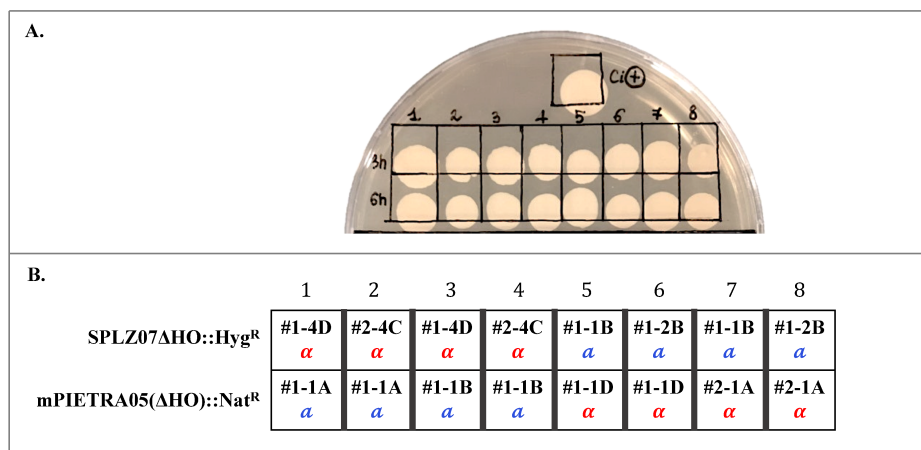


**Figura 4.8. Analisi quantitativa dell'acido acetico prodotto dai ceppi di lievito a fine fermentazione.** Nel pannello A sono riportati i valori ottenuti per il ceppo SPLZ07 e i suoi derivati; nel pannello B quelli relativi al ceppo mPIETRA05 e suoi derivati. I dati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti (± SD).

Sia per SPLZ07 che per mPIETRA05, i dati hanno evidenziato nei ceppi aploidi un generale aumento della produzione di acido acetico, rispetto ai ceppi parentali. Tale comportamento, mai osservato e ancora senza spiegazione, potrebbe tuttavia riflettere una caratteristica metabolica tipica dello stato aploide che verrebbe a modificarsi in quello diploide, i.e., nei ceppi parentali.

#### 4.5 CREAZIONE IBRIDI

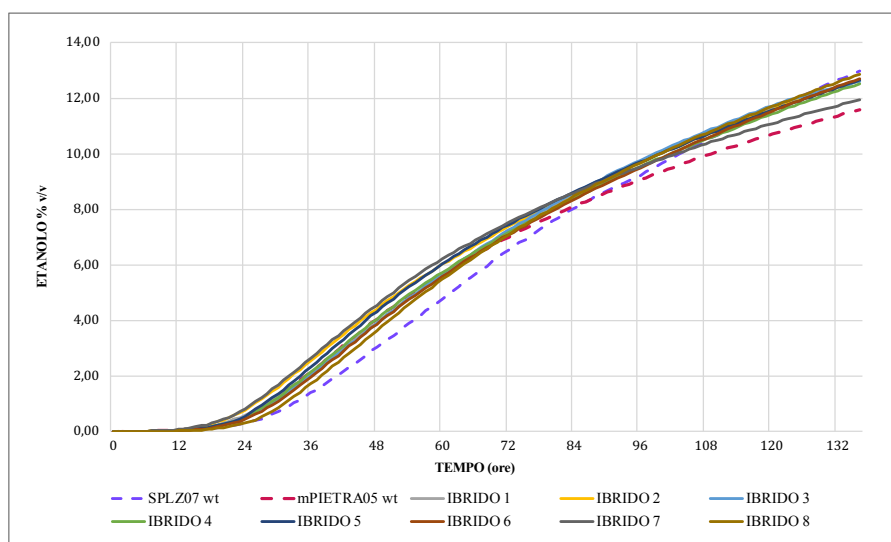
La tecnica di ibridazione utilizzata in questo lavoro di Tesi è stata estremamente semplice, svolgendosi come descritto in Metodi direttamente attraverso la miscela di cellule aploidi di tipo sessuale opposto. In particolare, l'ibridazione dei ceppi è avvenuta incrociando gli aploidi SPLZ07 $\Delta$ HO::HygR con gli aploidi mPIETRA05( $\Delta$ HO)::NatR, secondo uno schema che ha portato alla generazione di otto ceppi ibridi SPLZ07/mPIETRA05. Le cellule di ciascun incrocio sono state depositate su terreno selettivo contenente entrambi gli antibiotici, dove possono sopravvivere solo le cellule diploidi prodotte dalla coniugazione, come si può osservare nella Figura 4.9.



**Figura 4.9. Ibridazione dei ceppi di lievito aploidi.** 4 ceppi aploidi (2 MAT $\alpha$  e 2 MAT $\alpha$ ) di SPLZ07 $\Delta$ HO::HygR sono stati incrociati con altrettanti aploidi di mPIETRA05( $\Delta$ HO)::NatR (pannello A), generando in totale 8 ibridi diploidi (pannello B), capaci di crescere su terreno con doppia selettività (igromicina e nourseotricina); C+: controllo positivo (ceppo HygR/NatR).

#### 4.6 PROVE DI FERMENTAZIONE IBRIDI

Gli otto ceppi ibridi (#1-8) sono stati quindi utilizzati per allestire le prove di fermentazione in mosto naturale Pignoletto, analogamente a quanto effettuato in precedenza. Dalle 4 prove sperimentali indipendenti, sono stati ricavati i grafici delle cinetiche fermentative riportati nella Figura 4.10.



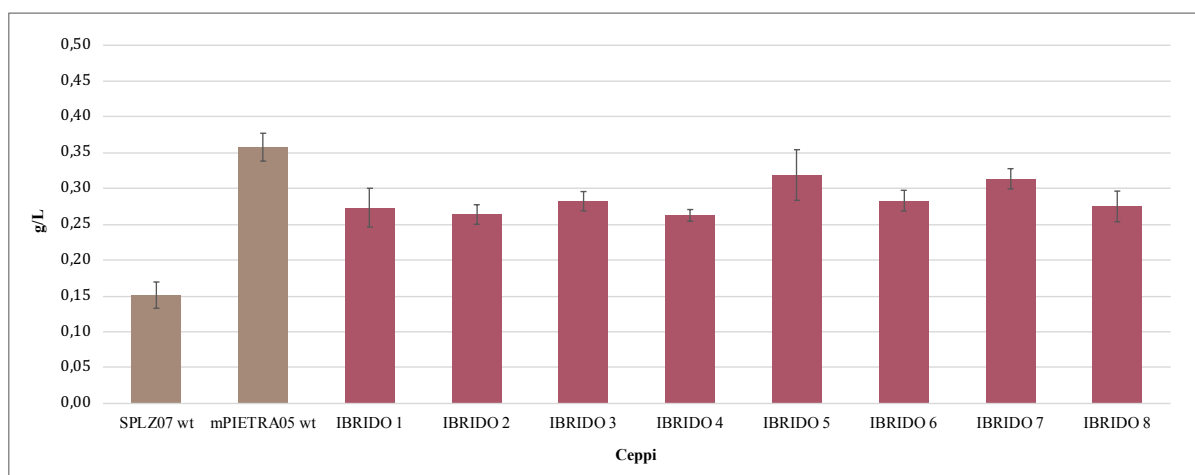
**Figura 4.10. Cinetiche fermentative dei lieviti.** I ceppi parentali SPLZ07 e mPIETRA05 (linee tratteggiate) ed i ceppi ibridi sono stati monitorati durante le fermentazioni in mosto Pignoletto, registrando la quantità di alcol (etanolo % v/v) prodotta nel tempo. Le curve sono state ottenute analizzando i dati provenienti da quattro esperimenti indipendenti e riportano la media dei valori registrati. Le barre di errore non sono state riportate per permettere una maggiore chiarezza grafica delle curve.

La cinetica di fermentazione dei diversi ceppi ibridi SPLZ07/mPIETRA05 ha mostrato un andamento simile a quello dei ceppi parentali, attestandosi a livelli di etanolo finale comparabili a quelli più elevati del lievito SPLZ07, più che a mPIETRA05, mostrando complessivamente un grado alcolico omogeneo tra i ceppi ibridi. Le quantità di etanolo prodotto (% v/v), misurate a fine fermentazione, sono riportate nella seguente Tabella 4.2.

Ceppi	SPLZ07 wild-type	mPIETRA0 5 wild-type	IBRIDO #1	IBRIDO #2	IBRIDO #3	IBRIDO #4	IBRIDO #5	IBRIDO #6	IBRIDO #7	IBRIDO #8
<b>EtOH % (v/v)</b>	12,97 ± 0,08	11,57 ± 0,19	12,64 ± 0,33	12,62 ± 0,21	12,59 ± 0,20	12,51 ± 0,12	12,64 ± 0,22	12,69 ± 0,13	11,93 ± 0,88	12,85 ± 0,04

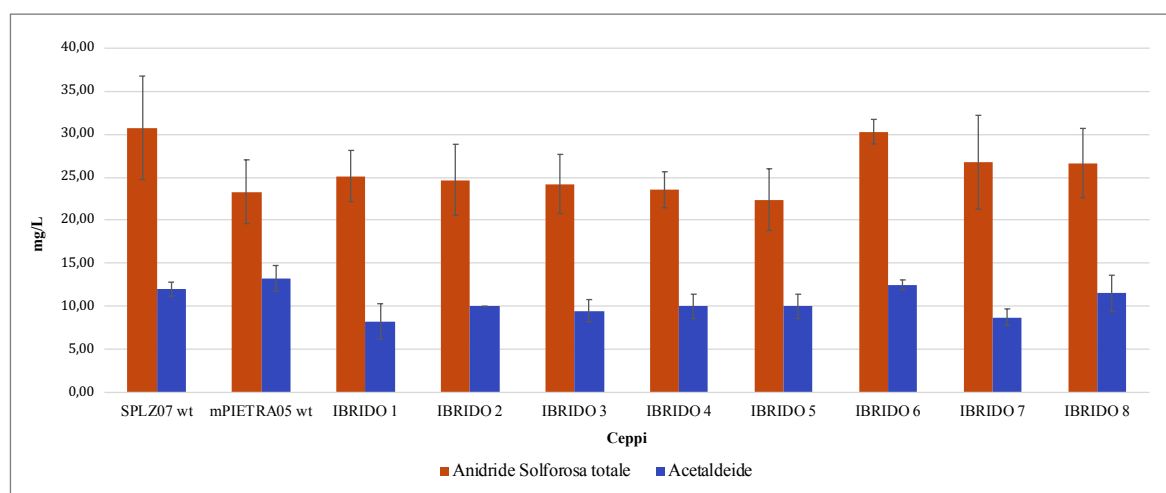
**Tabella 4.2. Valori di etanolo (% v/v) prodotti in mosto naturale Pignoletto a fine fermentazione.** I dati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti ( $\pm$  SD); nella prima e seconda riga sono riportati i risultati dei parentali SPLZ07 e mPIETRA05, nelle righe successive quelli degli ibridi.

Mediante HPLC, sono state effettuate anche le analisi quantitative dell'acido acetico, con i risultati riportati nella Figura 4.11. Come atteso, i ceppi parentali hanno mostrato una diversa capacità di produrre acido acetico, con una quantità circa doppia rilasciata da mPIETRA05 rispetto a SPLZ07. I ceppi ibridi hanno generalmente dimostrato un comportamento intermedio, con una produzione di acido acetico diminuita di circa il 20% rispetto al ceppo parentale mPIETRA05, nonostante due tra essi (#5 e #7) abbiano raggiunto livelli di acido acetico leggermente superiori agli altri ibridi.



**Figura 4.11. Analisi quantitativa dell'acido acetico prodotto dai ceppi di lievito durante la fermentazione.** Nel grafico sono riportati i valori di concentrazione di acido acetico presenti nel mosto fermentato, ottenuti dai ceppi parentali SPLZ07 e mPIETRA05 e dai diversi ibridi (#1-#8). I dati rappresentano la media di quattro valori indipendenti ( $\pm$  SD).

Sui prodotti finali delle fermentazioni, sono state effettuate ulteriori analisi, volte a valutare i livelli di importanti metaboliti secondari prodotti dai ceppi ibridi rispetto ai parentali. In particolare, i campioni sono stati sottoposti a titolazione iodometrica per la determinazione dell'anidride solforosa, ed è stata inoltre valutata la produzione di acetaldeide, secondo le procedure descritte in Metodi. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 4.12.

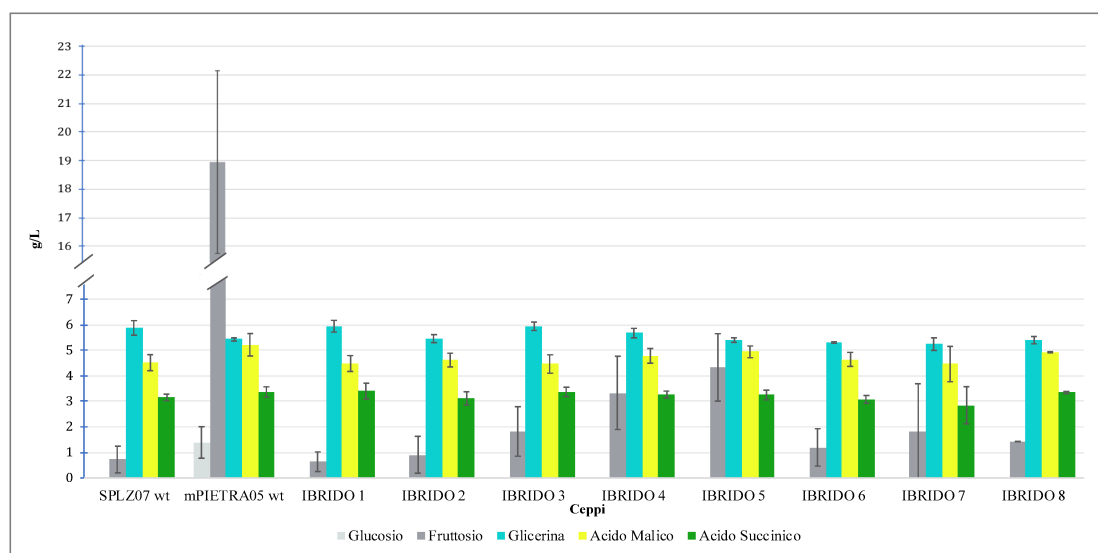


**Figura 4.12. Analisi quantitativa di anidride solforosa e di acetaldeide prodotte a fine fermentazione.** Nel grafico sono riportati i valori di concentrazione di  $SO_2$  e acetaldeide misurati nei campioni dei ceppi parentali SPLZ07 e mPIETRA05, e dei diversi ibridi (#1-8). I valori rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti ( $\pm$  SD).

I dati hanno indicato che, per l'anidride solforosa, gli ibridi hanno generalmente prodotto livelli più simili a quelli del ceppo parentale mPIETRA05, ad eccezione dell'ibrido #6, più vicino al parentale

SPLZ07. D'altra parte, non sono state riscontrate significative differenze nella produzione di acetaldeide tra i diversi ceppi ibridi, rispetto ai lieviti parentali.

Sui prodotti di fermentazione, è stata poi eseguita l'analisi quantitativa di altri metaboliti secondari, usando la tecnica di cromatografia liquida (HPLC), descritta in Metodi. I risultati ottenuti (Figura 4.13) non hanno mostrato differenze significative tra i ceppi parentali e gli ibridi per la produzione di glicerolo, di acido malico e di acido succinico, ma hanno tuttavia evidenziato la diversa capacità dei lieviti di consumare gli zuccheri presenti nel mosto: il ceppo parentale SPLZ07 è stato in grado infatti di consumare il fruttosio molto più efficacemente del ceppo parentale mPIETRA05, come dimostrato dall'elevata quantità di tale zucchero presente come residuo alla fine della fermentazione condotta da mPIETRA05. I ceppi ibridi hanno in generale mostrato capacità di utilizzo del fruttosio simili tra loro e paragonabili a quelle del ceppo parentale SPLZ07.



**Figura 4.13. Analisi quantitativa dei principali metaboliti secondari prodotti durante la fermentazione.** Nel grafico sono riportati i risultati per ciascun composto relativi ai ceppi parentali ed agli ibridi, e rappresentano la media di quattro valori indipendenti ( $\pm$  SD).

Sui prodotti di fermentazione, ottenuti dai 6 lieviti ibridi più omogenei tra loro (#1-4; #6; #8), sono state condotte ulteriori analisi quantitative mediante gas-cromatografia, al fine di valutare il contenuto di specifici metaboliti volatili prodotti durante la fermentazione, ovvero di molecole aromatiche che contribuiscono a definire le caratteristiche sensoriali del prodotto finale. I diversi composti analizzati sono stati poi raggruppati in classi legate alla loro natura chimica (alcoli superiori, acidi carbossilici, esteri etilici e terpenoidi), e complessivamente associate a tratti sensoriali, quali rispettivamente aroma vegetale, sudore, fruttato e floreale. In Tabella 4.3 sono riportate le concentrazioni totali delle molecole appartenenti a ciascuna categoria.

	SPLZ07 wt	mPIETRA05 wt	IBRIDO 1	IBRIDO 2	IBRIDO 3	IBRIDO 4	IBRIDO 6	IBRIDO 8
ALCOLI TOTALI mg/L	189,80 ± 23,89	187,28 ± 21,73	212,43 ± 25,17	219,53 ± 14,33	228,73 ± 12,99	259,54 ± 16,94	215,87 ± 15,86	223,70 ± 0,80
ACIDI CARBOSSILICI mg/L	7,83 ± 0,53	10,89 ± 0,15	9,97 ± 0,17	9,42 ± 0,15	10,64 ± 1,16	10,03 ± 0,82	9,40 ± 0,27	10,55 ± 0,16
ESTERI TOTALI mg/L	2,44 ± 0,30	2,15 ± 0,13	2,78 ± 0,59	2,73 ± 0,45	3,06 ± 0,60	2,95 ± 0,66	2,58 ± 0,36	2,73 ± 0,36
TERPENOIDI TOTALI µg/L	105,40 ± 54,93	98,75 ± 10,90	120,52 ± 6,34	121,76 ± 19,97	117,79 ± 25,07	100,44 ± 18,19	136,56 ± 5,85	106,33 ± 2,96

**Tabella 4.3. Risultati analisi in GC-MC.** I dati rappresentano le concentrazioni totali dei diversi metaboliti appartenenti a ciascuna classe ( $\pm$  SD), ottenute dalla somma dei valori registrati per le singole molecole (riportati in Tabella Supplementare S1).

Nonostante qualche lieve differenza, come le quantità leggermente più elevate di esteri totali prodotte dall'Ibrido #3, potenzialmente correlabili ad un diverso impatto per gli aromi fruttati, i livelli delle molecole appartenenti alle diverse categorie si sono dimostrati molto simili per i ceppi ibridi rispetto ai parentali. Inoltre, non sono stati rilevati composti carbonilici tipicamente indesiderati, come diacetile e acetoino. I risultati complessivi per ciascuna molecola analizzata sono comunque riportati nella Tabella Supplementare S1.

Nel loro insieme, i risultati hanno dimostrato che le attitudini fermentative dei lieviti parentali si sono complessivamente mantenute nei ceppi ibridi, e che essi sono caratterizzati da una produzione di acido acetico intermedia tra SPLZ07 e mPIETRA05, ma hanno anche evidenziato la loro capacità di consumare efficacemente il fruttosio, analogamente al ceppo parentale SPLZ07. Pertanto, il carattere fenotipico di mPIETRA05 che si desiderava mitigare appare in effetti attenuato negli ibridi (almeno parzialmente), i quali risultano peraltro più abili ad utilizzare gli zuccheri presenti nel mosto.

In conclusione, questo lavoro di Tesi ha permesso di effettuare una rapida valutazione del risultato di un incrocio tra due specifici ceppi di lievito, utilizzando ibridi generati con tempistiche notevolmente ridotte rispetto a quelle necessarie normalmente. Seppure promettenti, i risultati sono però da considerarsi ancora preliminari: infatti, per riprodurre più fedelmente le condizioni di fermentazione in cantina, i ceppi ibridi dovrebbero essere valutati in prove sperimentali di vinificazione, seguita dalla valutazione del prodotto a livello sensoriale.



## 5. DISCUSSIONE

Complessivamente, in questo lavoro di Tesi è stato dimostrato che è possibile generare nuovi ceppi ibridi del lievito *S. cerevisiae*, e valutare le loro prestazioni, con tempistiche notevolmente ridotte rispetto a quelle normalmente necessarie, mediante una strategia alternativa di ibridazione basata sull'uso dell'ingegneria genetica (i.e., CRISPR-Cas9). In particolare, l'obiettivo è consistito nel ridurre gli alti livelli di acido acetico prodotti dal ceppo mPIETRA05 attraverso il suo incrocio con SPLZ07, un lievito considerato basso produttore di acido acetico, entrambi appartenenti alla collezione dell'Azienda Italiana Biotecnologie, partner del progetto di ricerca.

Come la quasi totalità dei lieviti di uso enologico, essi presentano infatti il carattere dell'omotallismo, che in natura risulta vantaggioso in termini di adattamento ambientale: un lievito omotallico, rispetto ad uno eterotallico, è in grado di generare immediatamente una nuova popolazione diploide a partire da singole spore, senza dover ricercare un partner diverso, data la capacità di operare il cambio del *mating-type*. Tale carattere costituisce tuttavia un elemento di grande criticità in ambito industriale, soprattutto a causa delle notevoli difficoltà sperimentali nell'isolare le spore aploidi a partire dai ceppi da incrociare. Poiché in *S. cerevisiae* un singolo fattore è responsabile dell'omotallismo, ovvero l'endonucleasi codificata dal gene *HO* (vedi Introduzione), in questo lavoro è stata operata nei lieviti mPIETRA05 e SPLZ07 la specifica delezione di *HO*, sostituendolo con un marcatore dominante (i.e., antibiotico-resistenza), determinando la conversione di entrambi i ceppi da omotallici a eterotallici (diploidi). Complessivamente, le procedure per la modificazione genetica dei lieviti mediante il sistema CRISPR-Cas9 sono state eseguite con successo per entrambi i ceppi di lievito, ovvero senza particolari inconvenienti, trattandosi di tecniche ormai già standardizzate nel Laboratorio. Tuttavia, sono emerse alcune criticità legate alla diversità genetica dei ceppi naturali di lievito, come per la verifica molecolare del marcatore NatR nel ceppo mPIETRA05, che non hanno comunque impedito la progressione degli esperimenti, e che potranno essere rapidamente risolte, ad esempio con l'utilizzo di nuovi differenti primer.

Con la sporulazione, dai diploidi eterotallici sono state rapidamente ottenute le spore aploidi, necessarie per l'incrocio. Quindi, la conformità tra le caratteristiche dei ceppi aploidi rispetto ai corrispondenti parentali, considerata un fattore indispensabile, è stata analizzata per 4 diversi aploidi di ciascun ceppo. Mediante saggi di fermentazione in mosto naturale, sono stati valutati l'andamento dell'intero processo, la produzione finale di alcol e, naturalmente, di acido acetico. I dati ottenuti hanno mostrato cinetiche fermentative pressoché sovrapponibili per i ceppi aploidi ed i corrispondenti parentali, e livelli paragonabili anche di etanolo finale, sebbene lievemente inferiori (circa 2 % v/v) per i lieviti mPIETRA05 rispetto a quelli SPLZ97. Sorprendentemente, tutti i ceppi aploidi hanno prodotto livelli di acido acetico leggermente superiori a quelli dei parentali, suggerendo che l'assetto

genomico (aploide/diploide) potrebbe essere correlato al metabolismo dell'acido acetico, sebbene non ci siano evidenze riportate al momento in letteratura.

La rapidità nel generare gli ibridi, semplicemente incrociando i lieviti aploidi in terreno liquido, e la facilità di selezionare i ceppi con specifici antibiotici, hanno nettamente evidenziato i vantaggi della strategia utilizzata in questa Tesi, rispetto alla complessa procedura di coniugazione meccanica tra spore propria dell'ibridazione classica.

Successivamente, sono state allestite diverse prove fermentative in mosto naturale (Pignoletto) per valutare le prestazioni degli 8 diversi ibridi, comparandole con i parentali mPIETRA05 e SPLZ07. Nel complesso, i risultati hanno dimostrato che i ceppi ibridi possiedono capacità fermentative paragonabili tra loro, e più simili a SPLZ07, anche considerando la produzione finale di etanolo, con la sola eccezione dell'ibrido #7, somigliante invece al parentale mPIETRA05. I dati relativi alle misurazioni di acido acetico hanno poi evidenziato per i ceppi ibridi una produzione intermedia tra i due parentali, con una diminuzione di circa il 25% rispetto al ceppo mPIETRA05, indicando una (almeno) parziale mitigazione di tale carattere del lievito parentale.

Sui mosti fermentati dai diversi lieviti sono state effettuate ulteriori analisi quantitative, in modo da valutare il livello di svariati metaboliti secondari rilasciati dal lievito durante la fermentazione, importanti per le proprietà sensoriali e la qualità del vino finale.

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare una diversa capacità dei lieviti di utilizzare gli zuccheri presenti nel mosto: in particolare, il ceppo parentale mPIETRA05 a fine fermentazione ha consumato molto meno fruttosio rispetto sia al parentale SPLZ07, sia ai diversi ceppi ibridi, mentre tutti i lieviti sono stati in grado di utilizzare (quasi) totalmente il glucosio. Pertanto, gli ibridi hanno mostrato una similarità con il ceppo SPLZ07 per il carattere fruttosifilia, la cui eterogeneità nei lieviti è spesso collegata alla presenza di varianti o mutazioni a livello dei trasportatori cellulari degli zuccheri esosi (HXT, *hexose transporters*) (Perez et al., 2005; Guillaume et al., 2007).

Le analisi di altri metaboliti secondari (i.e., anidride solforosa, acetaldeide, glicerolo, acido malico, acido succinico) hanno poi indicato livelli di produzione nei ceppi ibridi del tutto paragonabili tra loro e rispetto ai lieviti parentali. Analogamente, dalle analisi quantitative di svariati composti volatili prodotti durante la fermentazione (i.e., alcoli superiori, acidi carbossilici, esteri, terpenoidi), non sono emerse particolari differenze tra i lieviti parentali ed i diversi ceppi ibridi, ad eccezione di uno di essi (#3), capace di produrre livelli leggermente più elevati di alcuni esteri, in particolare etil-esanoato e etil-ottanoato, associati ad aromi di mela verde, e pesca (frutta fresca), ed isoamile acetato, collegato ad aromi di banana e pera (frutta matura).

Quindi, nel loro insieme, i risultati hanno dimostrato che gli ibridi ottenuti in questa Tesi, incrociando i ceppi mPIETRA05 e SPLZ07, mantengono la piena capacità di sostenere l'intero processo di

fermentazione, con una produzione di acido acetico intermedia rispetto ai parentali, e con una buona capacità di utilizzare anche il fruttosio presente nel mosto.

Resta tuttavia ancora da verificare il comportamento dei lieviti ibridi in specifiche prove sperimentali di micro-vinificazione, che potrebbero fornire indicazioni più precise sui risultati ottenibili in cantina, come anche utilizzare mosti diversi per valutare attitudini specifiche dei lieviti.

Per l'Azienda partner di progetto, i risultati di questa Tesi forniscono informazioni indispensabili per valutare se l'incrocio tra questi due ceppi si possa definire interessante e promettente: di certo, con la strategia di incrocio qui impiegata, il tempo necessario per ottenere tali informazioni è stato ridotto a pochi mesi, invece dei 2-3 anni necessari con le tecniche classiche. Qualora l'incrocio venga giudicato positivamente, si renderà comunque necessario un programma di ibridazione tradizionale, per ottenere lieviti utilizzabili in ambito industriale: la strategia qui utilizzata produce infatti lieviti geneticamente modificati, il cui impiego è limitato o impedito dalle normative di legge presenti in molti Paesi. In conclusione, il sistema usato in questa Tesi per costruire ceppi ibridi mediante tecniche di ingegneria genetica è oltremodo efficace per valutare rapidamente la fruttuosità di possibili incroci intraspecifici.

## 6. CONCLUSIONI

In questo lavoro di Tesi, mediante l'ingegneria genetica è stata messa a punto una strategia alternativa di ibridazione nel lievito *S. cerevisiae*, che ha permesso la creazione di nuovi ceppi ibridi in tempi estremamente contenuti. In particolare, lo scopo è stato quello di abbassare i livelli di acido acetico prodotti dal ceppo mPIETRA05 incrociandolo con il ceppo SPLZ07.

Complessivamente, i risultati ottenuti hanno mostrato che i ceppi ibridi generati con tale procedura sono capaci di sostenere la fermentazione, producono livelli intermedi di acido acetico rispetto ai ceppi parentali mPIETRA05 e SPLZ07, e possiedono una buona capacità di utilizzare gli zuccheri presente nel mosto.

Rispetto al sistema di ibridazione classica, l'attuazione di un programma sperimentale di questo tipo è risultata estremamente vantaggiosa, consentendo di valutare molto rapidamente la fruttuosità di un incrocio tra due ceppi selezionati, fornendo quindi informazioni indispensabili per decidere se produrre un ibrido da utilizzare in ambito industriale, che dovrà tuttavia essere generato attraverso l'ibridazione tradizionale dei ceppi, che produce lieviti ibridi non-OGM.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Alexandre H., Nguyen Van Long T., Feuillat M., Charpentier C. (1994). *Contribution à l'étude des bourbes: influence sur la fermentescibilité des moûts*. Rev Fr Eno 146:11–20.

Aranda A., Matallana E., Del Olmo M. (2011). *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier. 32 Jamestown Road, London, NW1 7BY, UK. pp.1-31.

Attfield, P. V.; Kletsas, Sophia. (2000). *Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium*. Letters in Applied Microbiology, 31.4: 323-327.

Attfield P. V., Bell P. J. L. (2003). *Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts*. In: De Winde JH, editor. Functional Genetics of Industrial Yeasts. Berlin: Springer; pp. 17–56. , Vol. 1.

Bakalinsky A. T., Snow R. (1990). *Conversion of wine strains of Saccharomyces cerevisiae to heterothallism*. Appl Environ Microbiol.; 56:849–857.

Barbosa C., Falco V., Mendes-Faia A., Mendes-Ferreira A. (2009). *Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by Saccharomyces cerevisiae wine strains*. J Biosci Bioeng 108:99–104.

Barnett J. A., Entian K. D. (2005). *A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism*. Yeast. Aug;22(11):835-94. doi: 10.1002/yea.1249. PMID: 16134093.

Belton J. M., Lajoie B. R., Audibert S., Cantaloube S., Lassadi I., Goiffon I., Baù D., Marti-Renom M. A., Bystricky K., Dekker J. (2015). *The Conformation of Yeast Chromosome III Is Mating Type Dependent and Controlled by the Recombination Enhancer*. Cell Rep. Dec 1;13(9):1855-67. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.063. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26655901; PMCID: PMC4681004.

Bely M., Sablayrolles J. M., & Barre P. (1990). *Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions*. J. Ferment. Bioeng., 70, 246e252.

- Bely M., Rinaldi A., Dubourdieu D. (2003). *Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by Saccharomyces cerevisiae during high sugar fermentation*. J Biosci Bioeng 96:507–512.
- Bisson L. (1999). *Stuck and sluggish fermentations*. Am. J. Enol. Viticult., 50, 107e119.
- Blasco L., Veiga-Crespo P., Vinas M., Villa T. G. (2011). *A new disruption vector (pDHO) to obtain heterothallic strains from both Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces pastorianus*. Int Microbiol. ;14:201–206.
- Blomberg A., Adler L. (1992). *Physiology of osmotolerance in fungi*. Adv Microb Physiol.;33:145-212. doi: 10.1016/s0065-2911(08)60217-9. PMID: 1636508.
- Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F, Kunkee R. E. (1996). *Principles and practices of winemaking*, 1st edn. Chapman & Hall, New York.
- Cabras P., Martelli A. (2004). *Chimica degli alimenti*, PICCIN, ISBN 88-299-1696-X.
- Carpaena M., Fraga-Corral M., Otero P., Nogueira R. A., Garcia-Oliveira P., Prieto M. A., Simal-Gandara J. (2020). *Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile*. Foods. Dec 27;10(1):51. doi: 10.3390/foods10010051. PMID: 33375439; PMCID: PMC7824511.
- Carrascosa Alfonso V., Munoz Rosario, González Ramón. (2011) *Molecular Wine Microbiology*. DOI <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01909-6>, ISBN 978-0-12-375021-1 © Elsevier Inc.
- Casselton L. A. (2002). *Mate recognition in fungi*. Heredity (Edinb). Feb;88(2):142-7. doi: 10.1038/sj.hdy.6800035. PMID: 11932772.
- Coote N., Kirsop H. H. (1974). *The content of some organic acids in beer and other fermented media*. J Inst Brew 80:474–483.
- Dashko S., Zhou N., Compagno C., Piškur J. (2014). *Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?* FEMS Yeast Res. 2014 Sep;14(6):826-32. doi: 10.1111/1567-1364.12161. Epub Jun 9. PMID: 24824836; PMCID: PMC4262006.

- Di Gianvito P., Perpetuini G., Tittarelli F., Schirone M., Arfelli G., Piva A., Patrignani F., Lanciotti R., Olivastri L., Suzzi G., Tofalo R. (2018). *Impact of Saccharomyces cerevisiae strains on traditional sparkling wines production*. Food Res Int. Jul;109:552-560. doi: 10.1016/j.foodres.2018.04.070. Epub 2018 May 1. PMID: 29803483.
- Eldarov M. A., Kishkovskaia S. A., Tanaschuk T. N., Mardanov A. V. (2016). *Genomics and Biochemistry of Saccharomyces cerevisiae Wine Yeast Strains*. Biochemistry (Mosc). Dec;81(13):1650-1668. doi: 10.1134/S0006297916130046. PMID: 28260488.
- Gabaldón T. (2020). *Hybridization and the origin of new yeast lineages*. FEMS Yeast Res. Aug 1;20(5):foaa040. doi: 10.1093/femsyr/foaa040. PMID: 32658267; PMCID: PMC7394516.
- Goffeau A. et al. (1996). *The first sequencing of a eukaryotic genome, that of Saccharomyces cerevisiae*. Life with 6000 genes. Science 274, 563–567.
- Guillaume, C., P. Delobel, J. M. Sablayrolles, and B. Blondin. (2007). *Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast Saccharomyces cerevisiae: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation*. Appl Environ Microbiol. 73(8): 2432- 2439.
- Haber J. E. (2012). *Mating-type genes and MAT switching in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. May;191(1):33-64. doi: 10.1534/genetics.111.134577. PMID: 22555442; PMCID: PMC3338269.
- Ibragimova S. I., Kozlov D. G., Kartasheva N. N., Suntsov N. I., Efremov B. D., Benevolensky S. V. (1994). *A strategy for construction of industrial strains of distiller's yeast*. Biotechnol Bioeng. 46:285–290.
- Ingledeew, M., & Kunkee, R. E. (1985). *Factors influencing sluggish fermentations of grape juice*. Am. J. Enol. Viticult., 36, 65e76.
- Jouhten P., Ponomarova O., Gonzalez R., Patil K. R. (2016). *Saccharomyces cerevisiae metabolism in ecological context*. FEMS Yeast Res. 2016 Nov;16(7):fow080. doi: 10.1093/femsyr/fow080. Epub Sep 14. PMID: 27634775; PMCID: PMC5050001.
- Katz Ezov T., Chang S. L., Frenkel Z., Segre A. V., Bahalul M., Murray A. W., Leu J., Korol A. Kashi Y. (2010). *Heterothallism in Saccharomyces cerevisiae isolates from nature: effect of HO locus on the mode of reproduction*. Mol Ecol. 19:121–131.

- Klar A. J. (1987). *The mother-daughter mating type switching asymmetry of budding yeast is not conferred by the segregation of parental HO gene DNA strands*. *Genes Dev.* Dec;1(10):1059-64. doi: 10.1101/gad.1.10.1059. PMID: 2828162.
- Krogerus K., Magalhães F., Vidgren V., Gibson B. (2017). *Novel brewing yeast hybrids: creation and application*. *Appl Microbiol Biotechnol.* Jan;101(1):65-78. doi: 10.1007/s00253-016-8007-5. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27885413; PMCID: PMC5203825.
- Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L. and Cavalieri, D. (2006). *Ecological and evolutionary genomics of Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology Volume 15* pages 575–591.
- Lee C. S., Haber J. E. (2015). *Mating-type Gene Switching in Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr.* Apr;3(2): MDNA3-0013-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0013-2014. PMID: 26104712.
- Michael T. Madigan, John M. Martinko, David A. Stahl, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley. (2016). *Brock. Biologia dei microrganismi. Microbiologia generale, ambientale e industriale*; 14/Ed.
- Mans R., van Rossum H.M., Wijsman M., Backx A., Kuijpers N.G., van den Broek M, Daran-Lapujade P, Pronk JT, van Maris AJ, Daran JM. (2015). *CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2015 Mar;15(2). pii: fov004. doi: 10.1093/femsyr/fov004. Epub 2015 Mar 4. 10.1093/femsyr/fov004 PubMed 25743786.
- Martin S. G. (2019). *Molecular mechanisms of chemotropism and cell fusion in unicellular fungi*. *J Cell Sci.* May 31;132(11):jcs230706. doi: 10.1242/jcs.230706. PMID: 31152053.
- Merlini L., Dudin O., Martin S. G. (2013). *Mate and fuse: how yeast cells do it*. *Open Biol.* Mar 6;3(3):130008. doi: 10.1098/rsob.130008. PMID: 23466674; PMCID: PMC3718343.
- Mira N. P., Palma M., Guerreiro J. F., Sá-Correia I. (2010). *Genome-wide identification of Saccharomyces cerevisiae genes required for tolerance to acetic acid*. *Microb Cell Fact.* Oct 25;9:79. doi: 10.1186/1475-2859-9-79. PMID: 20973990; PMCID: PMC2972246.



Molina-Espeja P. (2020). *Next Generation Winemakers: Genetic Engineering in Saccharomyces cerevisiae for Trendy Challenges*. Bioengineering (Basel). Oct 14;7(4):128. doi: 10.3390/bioengineering7040128. PMID: 33066502; PMCID: PMC7712467.

Mortimer R. K., Romano P., Suzzi G., Polsinelli M. (1994). *Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of Saccharomyces cerevisiae derived from natural fermentation of grape musts*. Yeast. Dec;10(12):1543-52. doi: 10.1002/yea.320101203. PMID: 7725789.

Nishino, H., Miyazaki, S., & Tohjo, K. (1985). *Effect of osmotic pressure on the growth rate and the fermentation activity of wine yeast*. Am. J. Enol. Viticult., 36, 170e174.

Office Internationale de la Vigne et du Vin. (2009). *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Vol1 OIV, Paris, p 419.

Office Internationale de la Vigne et du Vin. (2010). *International code of oenological practices*. OIV, Paris, p 274

OIV Code Sheet – Issue 2021/01.

Ough, C. S. and Amerine, M. A. (1988). *Nitrogen compounds. Methods for analysis of must and wines* (2nd ed.), University of California, CA: John Wiley & Sons.

Ough, C. S. (1992). *Winemaking basics*. Binghamton, NY: Haworth Press Inc.

Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A. S., Hatziloukas E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications*. AIMS Microbiol. Feb 11;6(1):1-31. doi: 10.3934/microbiol.2020001. PMID: 32226912; PMCID: PMC7099199.

Perez, M., K. Luyten, R. Michel, C. Riou, and B. Blondin. (2005). *Analysis of Saccharomyces cerevisiae hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed*. FEMS Yeast Res. 5:351-361.

Ramirez M., Perez F., Regodon J. A. (1998). *A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol. 1998 Dec;64(12):5039-41. doi: 10.1128/AEM.64.12.5039-5041. PMID: 9835605; PMCID: PMC90965.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006a). *Alcohols and other volatile compounds. The chemistry of wine stabilization and treatments*. Handbook of enology, vol. 2, 2nd edn. Wiley, Chichester, pp 51–64

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2006b). *The microbiology of wine and vinifications*. Handbook of enology, vol. 1, 2nd edn. Wiley, Chichester.

Ribéreau-Gayon Pascal, Dubourdieu Denis, Donèche Bernard, Lonvaud A. (2007). *Trattato di Enologia I - Microbiologia del vino, Vinificazioni*; 3/Ed Edagricole-New Business Media. ISBN/EAN: 9788850651955

Robertson C. G., Clark-Cotton M. R., Lew D. J. (2021). *Mechanisms that ensure monogamous mating in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell. Apr 15;32(8):638-644. doi: 10.1091/mbc.E20-12-0757. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33596113; PMCID: PMC8108519.

Romano P., Soli M. G., Suzzi G., Grazia L., Zambonelli C. (1985). *Improvement of a wine Saccharomyces cerevisiae strain by a breeding program*. Appl Environ Microbiol. 50:1064–1067.

Schreier P. *Flavor composition of wines: a review*. (1979). CRC Crit Rev Food Sci Nutr. Nov;12(1):59-111. doi: 10.1080/10408397909527273. PMID: 389563.

Schuller D., Casal M. (2005). *The use of genetically modified Saccharomyces cerevisiae strains in the wine industry*. Appl Microbiol Biotechnol. Aug;68(3):292-304. doi: 10.1007/s00253-005-1994-2. Epub 2005 Apr 26. PMID: 15856224.

Scott Matthew P., Paul Matsudaira, Harvey Lodish, James Darnell, Lawrence Zipursky, Chris A. Kaiser, Arnold Berk, Monty Krieger. (2004). *Molecular Cell Biology*, 5<sup>a</sup> ed., WH Freeman and Col, NY, ISBN 0-7167-4366-3.

Sieber B., Coronas-Serna J. M., Martin S. G. (2022). *A focus on yeast mating: From pheromone signaling to cell-cell fusion*. Semin Cell Dev Biol. Feb 8:S1084-9521(22)00040-4. doi: 10.1016/j.semcdb.2022.02.003. Epub ahead of print. PMID: 35148940.

Sipiczki M. (2008). *Interspecies hybridization and recombination in Saccharomyces wine yeasts*. FEMS Yeast Res. 8:996–1007.

Spencer J. F. T. and Spencer D. M. (1997). *Yeasts in Natural and Artificial Habits*. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Yeasts and the Life of Man: Part II: Genetics and Molecular Biology of Industrial Yeasts and Processes; pages 243-263. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-03370-8>.

Steensels J., Snoek T., Meersman E., Picca Nicolino M., Voordeckers K., Verstrepen K. J. (2014). *Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity*. FEMS Microbiol Rev. 2014 Sep;38(5):947-95. doi: 10.1111/1574-6976.12073. Epub May 8. PMID: 24724938; PMCID: PMC4293462.

Styger G., Prior B., Bauer F.F. (2011). *Wine flavor and aroma*. J. Ind Microbiol Biotechnol. Sep;38(9):1145-59. doi: 10.1007/s10295-011-1018-4. Epub 2011 Jul 24. PMID: 21786136.

Suzzi G., Tofalo R. (2018). *Microbiologia Enologica*. Milano. Edagricole- edizioni agricole i new business media srl. Via Eritrea 21, Milan.

Szeto L., Broach J. R. (1997). *Role of alpha2 protein in donor locus selection during mating type interconversion*. Mol Cell Biol. Feb;17(2):751-9. doi: 10.1128/MCB.17.2.751. PMID: 9001229; PMCID: PMC231801.

Tofalo R., Suzzi G., Perpetuini G. (2021). *Discovering the Influence of Microorganisms on Wine Color*. Front Microbiol. Dec 3;12:790935. doi: 10.3389/fmicb.2021.790935. PMID: 34925298; PMCID: PMC8678073.

Twardowski T., Malyska A. (2015). *Uninformed and disinformed society and the GMO market*. Trends Biotechnol 33:1–3.

Van Zyl W. H., Lodolo E. J., Gericke M. (1993). *Conversion of homothallic yeast to heterothallism through HO gene disruption*. Curr Genet.;23:290–294.

Verduyn C., Postma E., Scheffers W. A., van Dijken J. P. (1990). *Physiology of Saccharomyces cerevisiae in anaerobic glucose-limited chemostat cultures*. J Gen Microbiol. Mar; 136(3):395-403. doi: 10.1099/00221287-136-3-395. PMID: 1975265.

Vilanova M., Ugliano M., Varela C., Siebert T., Pretorius I. S., Henschke P. A. (2007). *Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts*. Appl Microbiol Biotechnol 77:145–157.

Vilela-Moura A., Schuller D., Mendes-Faia A., Silva R. D., Chaves S. R., Sousa M. J., Côrte-Real M. (2011). *The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines*. Appl Microbiol Biotechnol. Jan;89(2):271-80. doi: 10.1007/s00253-010-2898-3. Epub 2010 Oct 8. PMID: 20931186.

Walker M., Vystavelova A., Pedler S., Eglinton J., Jiranek V. (2005). *PCR-based gene disruption and recombinatory marker excision to produce modified industrial Saccharomyces cerevisiae without added sequences*. J Microbiol Methods. 63:193–204.

Waterhouse, A. L. (2002). *Wine phenolics*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 957, 21e36.

Waterhouse A. L., Sacks G. L., Jeffery D. W. (2016). *Understanding of wine chemistry*. <https://doi.org/book/10.1002/9781118730720>.

Zaret K. S., Sherman F. (1985).  *$\alpha$ -Aminoadipate as a primary nitrogen source for Saccharomyces cerevisiae mutants*. J Bacteriol.;162:579–583.

Zilelidou E. A., Nisiotou A. (2021). *Understanding Wine through Yeast Interactions. Microorganisms*. Jul 29;9(8):1620. doi: 10.3390/microorganisms9081620. PMID: 34442699; PMCID: PMC8399628.

**Tabella S1. Risultati completi delle analisi in GC-MC. I dati rappresentano le concentrazioni delle molecole aromatiche appartenenti alle classi degli alcoli superiori, acidi grassi, esteri etilici, acetati e terpeni;  $\pm$  SD.**

		SPLZ07 wt	mPIETRA05 wt	IBRIDO 1	IBRIDO 2	IBRIDO 3	IBRIDO 4	IBRIDO 6	IBRIDO 8
	2-Metilpropanolo mg/L	22,87 $\pm$ 4,23	33,01 $\pm$ 0,04	32,25 $\pm$ 1,01	29,04 $\pm$ 0,22	29,38 $\pm$ 8,12	24,54 $\pm$ 3,74	28,31 $\pm$ 3,40	25,41 $\pm$ 0,60
	n-Butanolo mg/L	0,15 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,06
	2-Metilbutanolo mg/L	18,25 $\pm$ 1,16	19,58 $\pm$ 1,80	19,84 $\pm$ 2,34	21,59 $\pm$ 1,54	21,70 $\pm$ 2,06	25,68 $\pm$ 1,56	21,38 $\pm$ 1,47	22,00 $\pm$ 0,54
	3-Metilbutanolo mg/L	88,57 $\pm$ 2,36	94,89 $\pm$ 17,40	103,11 $\pm$ 19,93	112,71 $\pm$ 10,73	113,74 $\pm$ 7,27	138,94 $\pm$ 14,76	104,96 $\pm$ 12,38	113,09 $\pm$ 5,78
	2-Feniletanolo mg/L	53,95 $\pm$ 14,61	35,76 $\pm$ 2,25	51,95 $\pm$ 3,84	50,99 $\pm$ 2,14	57,61 $\pm$ 4,66	63,71 $\pm$ 3,54	55,66 $\pm$ 1,47	57,68 $\pm$ 4,94
ALCOLI SUPERIORI	Esanolo mg/L	0,51 $\pm$ 0,21	0,60 $\pm$ 0,07	0,56 $\pm$ 0,09	0,61 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,00
	Alcol Benzilico mg/L	0,21 $\pm$ 0,10	0,27 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,06
	trans-(E)-3-Esenolo mg/L	0,04 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01
	cis-(Z)-3-Esenolo mg/L	0,17 $\pm$ 0,08	0,20 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,05
	3-Etossipropanolo mg/L	1,61 $\pm$ 0,75	0,39 $\pm$ 0,13	0,80 $\pm$ 0,24	0,35 $\pm$ 0,05	0,76 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,09	0,25 $\pm$ 0,02
	3-Metiltiopropano mg/L	3,47 $\pm$ 0,35	2,38 $\pm$ 0,63	3,23 $\pm$ 0,56	3,59 $\pm$ 0,30	4,17 $\pm$ 0,11	5,04 $\pm$ 0,27	3,55 $\pm$ 0,17	3,96 $\pm$ 0,13
	Acido 2-metilpropanoico mg/L	0,82 $\pm$ 0,28	2,51 $\pm$ 0,02	1,83 $\pm$ 0,34	1,69 $\pm$ 0,26	1,99 $\pm$ 0,19	1,98 $\pm$ 0,16	1,37 $\pm$ 0,18	1,70 $\pm$ 0,20
	Acido Butanoico mg/L	0,54 $\pm$ 0,15	0,72 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,36	0,66 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,07
ACIDI GRASSI	Acido 3-metilbutanoico mg/L	0,17 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,00
	Acido Esanoico mg/L	1,85 $\pm$ 0,33	2,32 $\pm$ 0,27	2,13 $\pm$ 0,35	2,07 $\pm$ 0,32	2,13 $\pm$ 0,01	2,03 $\pm$ 0,29	1,81 $\pm$ 0,31	2,22 $\pm$ 0,26
	Acido Ottanoico mg/L	4,04 $\pm$ 0,30	4,29 $\pm$ 0,67	4,62 $\pm$ 0,57	4,22 $\pm$ 0,79	5,03 $\pm$ 0,11	4,38 $\pm$ 1,31	4,55 0,94	4,74 $\pm$ 0,67
	Acido Decanoico mg/L	0,86 $\pm$ 0,08	1,69 $\pm$ 0,10	1,16 $\pm$ 0,26	1,29 $\pm$ 0,45	1,76 $\pm$ 0,15	1,70 $\pm$ 0,51	1,89 $\pm$ 0,22	1,89 $\pm$ 0,05
	Etile Isobutirrato $\mu$ g/L	101,91 $\pm$ 13,39	75,20 $\pm$ 18,35	103,56 $\pm$ 0,38	78,04 $\pm$ 15,21	106,18 $\pm$ 6,10	75,11 $\pm$ 8,05	59,24 $\pm$ 21,43	64,67 $\pm$ 18,92
	Etil Butanoato $\mu$ g/L	734,22 $\pm$ 276,14	803,05 $\pm$ 37,99	825,05 $\pm$ 62,14	851,45 $\pm$ 81,02	873,57 $\pm$ 176,36	801,08 $\pm$ 126,58	853,23 $\pm$ 170,58	848,12 $\pm$ 163,61
	Etil 3-metilbutanoato $\mu$ g/L	3,44 $\pm$ 0,34	3,28 $\pm$ 1,02	4,72 $\pm$ 1,92	5,88 $\pm$ 2,09	5,08 $\pm$ 0,40	7,32 $\pm$ 0,85	4,04 $\pm$ 0,06	3,92 $\pm$ 0,00
ESTERI ETILICI	Etil Esanoato $\mu$ g/L	896,96 $\pm$ 132,48	791,16 $\pm$ 84,57	859,20 $\pm$ 78,86	871,76 $\pm$ 31,34	975,76 $\pm$ 60,98	944,24 $\pm$ 139,50	845,04 $\pm$ 217,79	1004,12 $\pm$ 228,71
	Etil Ottanoato $\mu$ g/L	305,20 $\pm$ 20,59	237,56 $\pm$ 0,96	330,16 $\pm$ 8,15	335 $\pm$ 54,25	374,76 $\pm$ 64,09	299 $\pm$ 1,41	303,12 $\pm$ 12,90	307,24 $\pm$ 21,89
	Etil Decanoato $\mu$ g/L	61,91 $\pm$ 6,10	79,20 $\pm$ 10,56	79,64 $\pm$ 6,41	79,56 $\pm$ 9,81	109,91 $\pm$ 20,30	95,24 $\pm$ 5,59	105,38 $\pm$ 14,39	86,27 $\pm$ 10,12
	Etil 2-fenilacetato $\mu$ g/L	4,68 $\pm$ 0,40	3,00 $\pm$ 0,28	4,48 $\pm$ 1,13	4,68 $\pm$ 0,62	5,84 $\pm$ 0,68	5,76 $\pm$ 0,23	4,56 $\pm$ 0,34	4,44 $\pm$ 0,06
	Isobutile Acetato $\mu$ g/L	60,80 $\pm$ 11,55	88,25 $\pm$ 0,60	107,24 $\pm$ 4,35	86,19 $\pm$ 0,89	113,35 $\pm$ 15,84	78,19 $\pm$ 9,23	74,53 $\pm$ 12,98	77,05 $\pm$ 13,22
	n-Butil Acetato $\mu$ g/L	45,36 $\pm$ 36,88	47,56 $\pm$ 42,37	50,36 $\pm$ 39,88	49,84 $\pm$ 42,43	95,54 $\pm$ 7,72	82,68 $\pm$ 9,90	43,96 $\pm$ 36,15	47,92 $\pm$ 42,31
ACETATI	Isoamile Acetato $\mu$ g/L	1929,01 $\pm$ 298,32	1710,44 $\pm$ 188,94	2482,23 $\pm$ 418,90	2324,21 $\pm$ 237,47	2591,71 $\pm$ 61,27	2245,64 $\pm$ 20,48	1922,32 $\pm$ 119,98	2173,94 $\pm$ 232,76
	n-Esil Acetato $\mu$ g/L	34,00 $\pm$ 9,96	33,76 $\pm$ 2,83	46,60 $\pm$ 4,47	42,52 $\pm$ 5,60	51,68 $\pm$ 2,38	46,52 $\pm$ 5,03	45,56 $\pm$ 14,31	45,76 $\pm$ 14,48
	2-Fenilettil Acetato $\mu$ g/L	624,12 $\pm$ 194,65	346,64 $\pm$ 5,77	696,92 $\pm$ 97,58	572,44 $\pm$ 68,05	802,60 $\pm$ 46,78	646,00 $\pm$ 42,31	590,44 $\pm$ 33,21	677,12 $\pm$ 68,22
	Linalolo $\mu$ g/L	6,52 $\pm$ 0,17	8,64 $\pm$ 0,91	7,48 $\pm$ 1,87	8,80 $\pm$ 2,04	9,60 $\pm$ 1,02	10,48 $\pm$ 1,24	9,04 $\pm$ 0,11	8,32 $\pm$ 0,34
	$\alpha$ -Terpineolo $\mu$ g/L	1,48 $\pm$ 0,51	1,64 $\pm$ 0,17	1,68 $\pm$ 0,11	1,80 $\pm$ 0,06	1,76 $\pm$ 0,45	1,88 $\pm$ 0,17	1,64 $\pm$ 0,17	1,88 $\pm$ 0,17
TERPENI	$\beta$ -Citronellolo $\mu$ g/L	41,64 $\pm$ 29,81	32,89 $\pm$ 4,09	47,04 $\pm$ 1,98	48,58 $\pm$ 13,55	41,91 $\pm$ 16,02	30,42 $\pm$ 8,71	50,82 $\pm$ 8,71	34,75 $\pm$ 0,55
	Nerolo $\mu$ g/L	46,60 $\pm$ 21,10	47,48 $\pm$ 6,62	54,80 $\pm$ 5,32	53,00 $\pm$ 3,22	55,60 $\pm$ 8,82	49,60 $\pm$ 7,13	64,44 $\pm$ 2,32	52,68 $\pm$ 1,64
	Geraniolo $\mu$ g/L	6,36 $\pm$ 1,64	6,02 $\pm$ 0,71	6,40 $\pm$ 0,57	6,58 $\pm$ 0,25	6,64 $\pm$ 0,51	6,34 $\pm$ 0,65	7,50 $\pm$ 0,82	6,50 $\pm$ 0,42